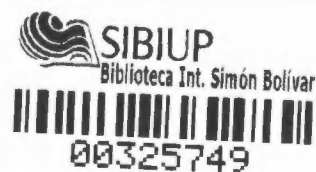


UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y TECNOLOGÍA



***MYCOPLASMA OVIS* EN SANGRE DE OVINOS, EN AMBIENTES
PECUARIOS DE LA REPUBLICA DE PANAMÁ.**

AUTOR
LICENCIADA DESSY GARRIDO
CÉDULA: 8-771-2428

ASESOR
Dra. Nora de Moreno

TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR AL GRADO
DE MAESTRO EN MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

ABRIL, 2017



Título de la Tesis:

"Mycoplasma Ovis en Sangre de Ovinos, en Ambientes Pecuarios de la República de Panamá"

TESIS

Sometida para optar al título de Maestría en Microbiología Ambiental

Vicerrectoría de Investigación y Postgrado

Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

APROBADO POR:

Doctora Nora O. de Moreno
Presidente

Doctor Carlos Moran
Miembro

Magister Brenda de Mayorga
Miembro

REFRENDADO POR:

REPRESENTANTE DE LA VICERRECTORÍA
DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

FECHA:

AGRADECIMIENTO

Al Departamento de Microbiología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Panamá. Agradezco de manera muy particular a la Dra. Nora de Moreno quien en su papel de tutora me brindo la orientación necesaria para la realización de este trabajo. A la Mgrt Indira del Carmen Espino por su ayuda y orientación en el análisis de Biología Molecular. También al Mgrt Gilberto Eskildsen por su guía en el análisis estadístico.

De igual manera a la Dra. Nacarí Jaramillo que junto con los estudiantes de la Facultad de Medicina Veterinaria facilitaron las muestras de sangre de ovinos para el proyecto. Además el aporte y financiamiento de este proyecto a través del Programa de Estimulo a las Actividades de Ciencia y Tecnología de la SENACYT (Secretaría Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación).

También agradezco al Dr. Emilio Moreno y al profesor Noriel Correa de la Escuela de Física por facilitar el dispositivo electrónico ARDUDROP 1.0 para la medición de la temperatura y humedad en campo.

Al Centro de Investigación en Entomología de la Universidad de Panamá, por su colaboración en la identificación de los vectores biológicos recolectados en el área.

A mis padres por su apoyo incondicional principal motor para poder culminar esta meta.

¡A todos muchas gracias!

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVO GENERAL Y ESPECIFICO	6
CAPITULO I Revisión Bibliografica	
I 1 Generalidades	8
I 2 Manejo del ganado ovino	9
I 3 Adaptabilidad de las ovejas	10
I 4 Sistema de produccion ovina	13
I 5 <i>Mycoplasma ovis</i>	19
CAPITULO II Materiales y Metodo	
II 1 Toma de muestra de sangre	23
II 2 Frotis sanguineo	23
II 3 Tincion de las muestras	23
II 4 Extraccion de ADN	25
II 5 Reaccion en cadena de la Polimerasa	26
II 6 Electroforesis	27
II 7 Evaluacion ambiental	29
CAPITULO III Resultados	31
CAPITULO IV Discusion	47
CAPITULO V Conclusion	52
CAPITULO VI Recomendacion	54
CAPITULO VII Bibliografia	56
ANEXOS	62

INDICE DE CUADRO

Cuadro 1	21
Cuadro 2	51
Cuadro A 1	63
Cuadro A 2	65
Cuadro A 3	66
Cuadro A 4	72
Cuadro A 5	73

INDICE DE FIGURA

Figura 1	22
Figura 2	30
Figura 3	30
Figura 4	30
Figura 5	34
Figura 6	35
Figura 7	36
Figura 8	37
Figura 9	38
Figura 10	39
Figura 11	40
Figura 12	41
Figura 13	42
Figura 14	43
Figura 15	44
Figura 16	45
Figura 17	46
Figura 18	50

RESUMEN

Este estudio se realizo en 6 fincas ubicadas en la provincia de Panamá, donde fueron recolectadas 71 muestras de sangre de ovejas con anemia para determinar la presencia de *Mycoplasma ovis* como agente etiologico de la anemia hemolitica.

Los 71 frotis sanguineos fueron teñidos con los colorantes Giemsa y Naranja de Acridina, resultando 41 muestras clasificadas como sospechosas por las tinciones con granulaciones basofilas y detecciones de ADN en los eritrocitos. A estas muestras se les realizaron extracciones de ADN como paso previo para realizar la prueba molecular Reaccion en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se amplificaron 10 muestras correspondientes a las fincas n°4 y n°5. Se observo una banda de ADN de 400 a 450 pares de bases en la muestra M4d-14 procedente de la finca N°4. Esto confirma la presencia de *Mycoplasma spp* en sangre de ovinos como primer reporte en fincas de la provincia de Panama.

Como factores que estan relacionados a la presencia y transmision del hemoparasito hallado en la finca N°4 se describe el indice de temperatura y humedad (ITH). Los resultados mostraron cifras muy por encima y debajo del indice adecuado u optimo para las ovejas que es de 23, lo que las hace vulnerables a la infeccion por *Mycoplasma ovis*. Ademas se capturaron mosquitos del genero *Culex spp* y garrapatas del genero *Amblyoma* los cuales son asociados como vectores biologicos en la transmisión del hemoparasito.

En base a todos los procedimientos y evaluaciones realizadas y considerando que el hallazgo se realizo en sangre concluimos que hemos detectado *Mycoplasma ovis* por primera vez en Panama.

SUMMARY

This study was carried out on six farms located in the province of Panama, where 71 blood samples from sheep with anemia were collected to determine the presence of *Mycoplasma ovis* as the etiologic agent of hemolytic anemia

The 71 blood smears were stained with Giemsa and Acridine Orange dyes resulting in 41 samples classified as suspect based on the analysis of basophilic strippling and DNA binding dyes detected in erythrocytes. DNA samples were taken from these samples as a preliminary step to perform the Polymerase Chain Reaction (PCR). Ten samples were amplified corresponding to farms N°4 and N°5. A DNA band of 400 to 450 base pairs was observed in sample M4d 14 coming from farm N°4. This is the first confirmation of the presence of *Mycoplasma* in sheep blood on farms in the province of Panama. The Temperature and Humidity Index (THI) revealed the presence and transmission of hemoparasite found on farm N°4. The results showed figures well above and below the appropriate or optimal index of 23 which makes the sheep vulnerable to the *Mycoplasma ovis* infection. In addition, they captured species of the genus *Culex spp* mosquitos and ticks from genus *Amblyoma spp* which are biological factors associated with hemoparasite transmission.

Based on all the procedures and evaluations performed and considering that the findings were based on blood samples, we conclude that *Mycoplasma ovis* was detected for the first time in Panama.

INTRODUCCIÓN

Los pequeños rumiantes como los ovinos y caprinos fueron una de las primeras especies que se domesticaron. Desde sus orígenes han producido múltiples beneficios al hombre. Pero en los dos últimos siglos la producción ovina se ha especializado dependiendo del área geográfica, los cambios en los hábitos y actitudes de los consumidores y el aumento de la población a nivel mundial (Sañudo Astiz Carlos 2008)

Por otra parte los sistemas de producción varían enormemente de un país a otro como reflejo de la diversidad de condiciones ambientales que determinan una gran variabilidad de razas, sistemas de alojamientos, niveles de intensificación productiva, calidad y demanda del mercado (Sañudo Astiz Carlos 2008)

De acuerdo con Saldaña (2005) a pesar de que en Panamá no existe la tradición de producir ovinos y caprinos en los últimos años se ha observado un incremento en el número de explotaciones (12% en 2001 de acuerdo a cifras de la Contraloría General de la República - 2001) impulsada principalmente por la creciente demanda de los productos que se derivan de estos pequeños rumiantes (Díazgrandos D 2011)

De la cría de ovinos se derivan múltiples productos: carne de gran valor nutritivo y muy aceptado en el mercado; pieles de buena calidad; leche con alto valor nutritivo; lana importante a nivel artesanal y otros subproductos potencialmente utilizados en industria y alimentos (Barrios C et al 2007)

Con frecuencia las ovejas son afectadas por tres tipos de enfermedades

- 1 Parasitarias que son las más frecuentes y a las que los ovinos son más susceptibles. Las hay externas e internas
- 2 Infecciosas causadas por bacterias y virus
- 3 Carenciales por deficiencias nutricionales (Barrios C et al, 2007)

En ovinos y caprinos las enfermedades infecciosas con cuadros hemolíticos son frecuentes producto de múltiples agentes etiológicos que son capaces de producir anemia, ictericia y hemoglobinuria (M K. Cynthia, 2007)

Mycoplasma ovis fue descrito en 1934 por Neitz et al en Sudáfrica. Este hemoparásito conocido anteriormente como *Eperythrozoon ovis* es un microorganismo encontrado en cuadros hemolíticos

Se trata de parásitos obligados de la membrana de los glóbulos rojos que se transmiten de unos animales a otros por diversos mecanismos como vectores (Mosquitos Moscas Pulgas Garrapatas y Acaros) que realizan la transferencia de sangre infectada (Robin W Allison, Jane E Sykes 2011)

Podemos decir entonces que el diagnóstico de este hemoparásito tiene una gran connotación, el cual no ha sido aplicado hasta ahora en Panamá

Un reporte en Argentina en el 2009 informa sobre los aspectos epidemiológicos clínicos y métodos de diagnósticos empleados en un brote de micoplasmosis ovina ocurrido en cercanías de Rosario de la Frontera Salta en una pequeña majada integrada por ovinos de origen local diverso (Aguirre D H et al 2009)

La infección por *Mycoplasma ovis* es generalmente asintomática, aunque se han descrito cuadros clínicos de curso crónico y agudo. La forma crónica se caracteriza por anemia moderada, fatiga y menor producción de carne y lana. En animales portadores la anemia puede eventualmente acentuarse por estrés inmunosupresión o enfermedades concurrentes. La forma aguda cursa con fiebre anemia grave ictericia, depresión, pérdida de peso y muerte (Aguirre D H. et al 2009)

La temperatura del aire la humedad la velocidad del viento y la radiación solar son factores causantes del estrés en estos animales. Son factores que tienen fuerte influencia sobre el consumo voluntario de alimento digestibilidad, metabolismo y la disipación del calor corporal (Díazgrandes D 2011)

El Índice de Temperatura y Humedad (ITH) es uno de los indicadores más utilizados para estimar la carga de calor a la que se ven sometidos los animales la cual puede generar al ovinicultor disminuciones significativas en el producto

Ante esta realidad y con la finalidad de ampliar y fortalecer los conocimientos en cuanto al estado de salud de los ovinos nos proponemos en este trabajo identificar el hemoparásito *Mycoplasma ovis* cuyo diagnóstico en pequeños rumiantes en estado anémico ayuda al ovinicultor tomar las medidas correspondientes y determinar si este microorganismo se encuentra en las fincas dedicadas a la ovinicultura en nuestro país

Además esta práctica pecuaria es una alternativa que suplende necesidades vitales del ser humano la cual se hace accesible a una población con limitaciones económicas

Una vez identificado *Mycoplasma ovis* se debe evaluar todos los parámetros que pueden influir en el desarrollo y transmisión de este hemoparásito

OBJETIVOS

Generales

- Determinar la presencia del hemoparasito *Mycoplasma ovis* como agente etiológico de la anemia hemolítica en ovinos en fincas de la provincia de Panama.
- Enumerar las condiciones ambientales del area que esten relacionadas con el desarrollo y transmision del hemoparasito

Especificos

- Determinar a traves de las pruebas de tamizaje (tincion de Giemsa y Naranja de Acridina) y una mas especifica como la tecnica molecular PCR (Reaccion en Cadena de la Polimerasa) un diagnostico de *Mycoplasma ovis* que permita confirmar que este agente es el que causa la anemia en los ovinos
- Comprobar dentro del area, la relacion que tienen los datos de temperatura y humedad ambiental obtenidos con la anemia causada por *Mycoplasma ovis*
- Identificar dentro del area, vectores biologicos que podrian estar asociados con la transmision del hemoparasito

CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1 1 GENERALIDADES

Las ovejas fueron domesticadas en el periodo neolitico La primera representacion artistica de ovejas en Egipto aparece en una de las mas antiguas esculturas conocidas que se remontan al año 4 000 a.c algunas esculturas posteriormente muestran uno de los primeros usos que se le dio a los ovinos el de hacerlos caminar o conducirlos a traves de los campos recién sembrados en el Valle del Nilo para enterrar el grano pisoteandolo (Producción ovina, 1973 editorial ateneo)

La clasificacion de los ovinos ha sido objeto de confusion por el asombroso numero de razas y de los notables cambios producidos por la domesticacion Los ovinos en domesticidad han llegado a depender completamente del hombre, son incapaces de retornar a la vida salvaje

Los ovinos provienen de lanares salvajes de Europa y Asia, principalmente de dos razas salvajes
a) Los Muflones (*Ovis musimon* y *Ovis orientalis*) y b) El Urial de Asia (*Ovis vignei*)

No obstante muchos datos indican que los ovinos salvajes de grandes cuernos de Asia pueden ser por lo menos uno de los progenitores de los grupos de Asia Central Ademàs tal vez algunas razas modernas proceden de otros ovinos salvajes aparte de los indicados (Producción ovina, editorial ateneo 1973)

La posicion de los ovinos en la escala zoologica es la siguiente (Gómez I Pinzón R. 1983)

Reino *Animal*

Subreino *Metazoos*

Tipo *Vertebrados*

Clase *Mamíferos*

Orden *Artiodactilos*

Suborden *Rumiantes*

Familia *Bovidos*

Subfamilia *Caprinos*

Genero *Ovis*

Existen mas de 200 razas de ovinos y cada una tiene características propias que la hacen importantes a la hora de ser incluidas dentro de un proyecto de ovinos (Barnos C et al, 2007)

Entre las razas mas famosas y reconocida mundialmente se encuentran (Barrios C et al 2007)

Razas de lana

- Categoria de carne Suffolk, Hampshire down Texel Dorset Cheviot
- Categoria prolifica Romanov Rideau arcott
- Categoria leche East Friesian Dairy, Manchega.

Razas de pelo

- Categoria de carne Dorper Katahdin, Pelibuey, Santa Ines Sant croix Beef master
- Categoria prolifica Black Belly

Los carneros ovejas y corderos comunes son por lo general animales esbeltos sus cabezas son algo puntiagudas en la parte anterior el pelaje es veloso y la cola corta. (Gómez I. Pinzón R. 1983) Son muy prolificos Las crias nacen en avanzado estado de desarrollo y son pronto capaces de seguir a la madre (El mundo de los animales 1971)

1 2 MANEJO DEL GANADO OVINO

La produccion de ovino representa una eleccion para el productor pecuario que actualmente se esta desarrollando de manera acelerada no solo entre los productores de subsistencia, sino en los comerciales que buscan mayor rentabilidad, un mejor precio ciclos de produccion mas cortos y menor inversion inicial (M E Ensminger "Producción Ovina" 1970)

Segun la funcion economica se dividen en carne lana, leche y piel pudiendo existir en ellas la doble finalidad y en algunos casos clasificando las ovejas prolificas en otra categoria

Segun el tipo de fibra se dividen en lana fina, media o pelo (Barrios C et al, 2007)

Entre las ventajas que ofrece la produccion ovina podemos enumerar las siguientes

- Alto indice de conversion alimenticia.
- Alto porcentaje de produccion
- Mayor aprovechamiento de recursos alimenticio
- No requieren grandes areas para mantenimiento
- Producen mas cantidad de carne por superficie
- Se obtienen productos de alto valor comercial

Esta actividad ovina en el medio tropical esta aumentando en importancia y representa una alternativa para la practica de una ganaderia diversificada ya que contribuye al desarrollo de areas marginadas por los menores requerimientos de capital y tierra (Diazgrandos D 2011)

1.3 ADAPTABILIDAD DE LAS OVEJAS

Uno de los factores que afecta el desarrollo de la actividad agropecuaria en el mundo son las condiciones climáticas

Las alteraciones en la temperatura y los regímenes de precipitación pueden provocar la propagación de enfermedades y parásitos en regiones nuevas o producir un incremento en la incidencia de enfermedades las que a su vez provocan una reducción en la productividad del sistema y posiblemente incremento en la mortalidad animal

Son animales homeotermos lo cual quiere decir que tratan de mantener su temperatura corporal dentro de niveles óptimos que les permite mantener el funcionamiento de su organismo sin tener que recurrir a mecanismo alguno ya sea para disipar o para ganar calor

El estrés calórico resulta de la inhabilidad del animal para disipar suficiente calor y mantener su homotermia. Altas temperaturas ambientales, humedad relativa y energía radiante compromete la habilidad del animal para disipar el calor (Díazgrandos D 2011)

Como resultado se produce un incremento en la temperatura corporal, la cual a su vez inicia los mecanismos compensatorios y de adaptación para tratar de restablecer su homotermia y homeostasis (Cardozo et al 2010)

Su productividad, eficiencia y desempeño es óptimo dentro de la zona termo-neutral (zona de confort) la cual está limitada en su extremo bajo por la temperatura más baja crítica, y en el extremo superior por la temperatura alta más crítica (Du Preez, et al 1990)

En este rango de temperatura ambiental la regulación de la temperatura corporal es conseguida con el mínimo esfuerzo

La zona termo-neutral depende de muchos factores entre los que incluyen, la especie, la raza, la edad, el nivel de nutrición, el nivel de producción, el estado fisiológico, la grasa corporal, el color del pelaje, el origen geográfico y el comportamiento (Cienzo 1996)

En condiciones de termo-neutralidad, la productividad al igual que la supervivencia del animal dependen principalmente de su capacidad de mantener la temperatura corporal dentro de los niveles constantes independientemente de las variaciones de temperatura ambiental (Johnson, 1987)

Para Abi Saab y Sleiman (1995) la tolerancia y adaptación de los animales están determinadas por las constantes fisiológicas como frecuencia respiratoria, frecuencia cardíaca y de la temperatura corporal

Algunos de los principales resultados de la actividad antropogenica han sido el incremento de los niveles atmosfericos de CO₂ las alteraciones de las propiedades biologicas y quimicas del suelo asi como el continuo uso y cambio de uso de la tierra En su conjunto estos hechos han provocado cambios climaticos a traves del planeta aumentando las temperaturas minimas y maximas para el periodo 1951 1990 Esta asimetria entre minimas y maximas ha sido detectada a traves de todas las estaciones del año en el planeta, particularmente en las regiones del hemisferio norte

Asimismo diversos modelos climaticos pronostican cambios en el clima del mundo con un aumento en la concentracion de CO₂ atmosferico incrementos de temperaturas y cambios en la distribucion de las precipitaciones Las estimaciones de incremento en la temperatura superficial media global son de un rango de 1.5 a 4.5 °C

Todo esto tendria profundos efectos en la produccion agropecuaria y de alimentos tanto para los animales como para el ser humano (Arias RA. Mader TL Escobar PC 2008)

El efecto del clima en la produccion animal ha sido estudiado desde hace aproximadamente medio siglo lograndose importantes avances en el entendimiento de los aspectos fisiologicos y de comportamiento animal bajo condiciones termo-neutrales y de estres climatico En este sentido muchas de las investigaciones en bioclimatologia animal se remontan a la decada del 50 donde comienzan de forma mas sistematica los primeros estudios que evaluan el efecto de la temperatura y la humedad en la salud de los animales los cuales en su mayoria fueron conducidos bajo camaras de ambiente controlado

Sin embargo el rapido avance computacional y tecnologico del ultimo tiempo ha posibilitado contar con modernos dispositivos electronicos y telemetricos que se traducen en un incremento en el numero de experimentos de campo bajo condiciones de produccion comercial Este tipo de dispositivos y de investigacion permiten tener un acucioso registro de los cambios de temperatura corporal la tasa de respiracion y la sudoracion asi como el consumo de alimento y agua

Asi en la actualidad es posible evaluar en forma conjunta el efecto de diversos factores tales como radiación solar humedad relativa, temperatura ambiental velocidad del viento precipitaciones tipo de dieta, nivel energetico de la dieta, genotipo etc (Arias RA. Mader TL Escobar PC

1.3 1 Temperatura ambiental

Esta es la variable mas investigada y al mismo tiempo la mas utilizada como indicadora del estres (Arias et al 2008)

El promedio de la temperatura ambiental es considerado como la principal medida termica utilizada para estimar el confort animal (NRC 1981)

El estres calorico ambiental para la oveja ocurre cuando la temperatura ambiental de la oveja supera los 31°C (Diazgrandos D 2011)

A pesar de la capacidad de adaptacion de las ovejas este estres termico causa alteracion en sus funciones vitales (circulacion, respiracion, ultrafiltracion renal metabolismo termorregulacion y control hormonal) y en la capacidad de produccion (requerimientos nutricionales actividad animal consumo de alimento y agua reproduccion y fertilidad desarrollo placentario y fetal salud crecimiento y la produccion de leche) (Diazgrandos D 2011)

La temperatura del aire es considerada el factor climatico con mas influencia sobre el ambiente fisico del animal (Neiva, 2004) y la mantencion de la temperatura corporal esta determinada por el equilibrio entre la pérdida y la ganancia del calor En la medida en que la temperatura ambiental aumenta, la eficiencia de la perdida de calor disminuye debido al menor gradiente de temperatura entre la piel del animal y el medio ambiente

En esta situacion, el animal puede en cierta medida, mantener la temperatura corporal a traves de la vasodilatacion que aumenta la temperatura de piel y el flujo de sangre periferica, sin embargo si la temperatura ambiental sigue aumentando el animal debera depender de la perdida de calor por evaporacion a traves de la respiracion y/o sudoracion (Ingram & Monte 1975) esta capacidad de perdida de calor esta relacionada con el gradiente termico entre la temperatura de la superficie y medio (Souza et al 2007)

1.3 2 Humedad relativa (Arias RA. Mader TL Escobar PC 2008)

La humedad relativa (HR) es considerada un factor de potencial estres en el ganado ya que acentua las condiciones adversas de las altas temperaturas Los principales efectos de la HR están asociados con una reduccion de la efectividad en la disipacion de calor por suuoracion y respiracion, y estan negativamente asociados al consumo diario de agua.

La tasa de evaporación depende de la gradiente de presión de vapor que existe entre el animal y el medioambiente circundante así como de la resistencia al movimiento en contra de la gradiente

Richards (1973) reportó que a temperaturas superiores a los 30°C la HR comienza a asumir un importante rol en los procesos evaporativos. En estas condiciones la simple gradiente de presión de vapor no es suficiente para asegurar una adecuada evaporación.

Así entonces altas HR reducen el potencial de disipación de calor tanto de la piel como del aparato respiratorio afectando a los animales especialmente en medioambientes en los que la disipación del calor por vías evaporativas es crucial para mantener la condición homeotérmica.

1.3.3 Índice de Temperatura - Humedad (ITH) (Díazgrandes D. 2011).

Desarrollado originalmente por Thom en 1959 como índice de confort térmico para los seres humanos fue utilizado más tarde para describir el confort térmico de los animales ya que Johnson et al. (1962) y Cargill y Stewart (1966) observaron disminuciones significativas en la producción, con el aumento en el valor del índice de temperatura y humedad. Este índice abarca los efectos combinados de la temperatura ambiental y la humedad relativa y el rendimiento animal. Se utiliza mayormente para evaluar el confort de los animales.

1.4 SISTEMAS DE PRODUCCIÓN OVINA (M. E. Ensminger "Producción Ovina" 1970)

Los sistemas de producción ovina. Pasturas en confinamientos y pastoreo conjunto son mecanismos que el productor determina al momento de criar y explotar este rubro. Estos sistemas conllevan una serie de procedimientos que permite el control de las crías que tenga el productor.

Esto permite aprovechar de manera segura los beneficios que se obtienen de este pequeño rumiante además previene y evita afecciones manteniéndolos en buen estado de salud.

Otro factor fundamental es la época de servicio (apto para aparearse). La oveja a diferencia de otros animales posee una actividad sexual estacional.

Factores como la temperatura ambiental y la nutrición influyen sobre la manifestación del celo en la oveja. Además se ha demostrado que la variación de la luz (fotoperíodo) es un factor que determina los fenómenos reproductivos y hormonales de esta especie. Se producen al disminuir la cantidad de horas de luz, a través del nervio óptico (Lira Amaya et al. 2015).

1 4 1 Alimentacion de los ovinos

Los ovinos están adaptados a pastorear sobre praderas naturales que les proveen una variedad de plantas forrajeras y se mantienen mejor con pastos cortos y finos que con los altos o gruesos

Aunque pueden comer cantidades considerables de malezas y matorrales prefieren las gramíneas y leguminosas. Excepto durante la época de partición o en el feedlot (corral de engorde) los ovinos rara vez reciben mucho grano.

En las regiones del norte las ovejas de los rebaños de granjas consumen frecuentemente de 1/4 a 1/2 kilogramo diario de una ración de granos además de la asignación de forraje desde un mes antes de la partición hasta el momento en que son conducidos a la pastura de primavera. Se les suministra niveles más altos de grano en el periodo de lactancia que durante la gestación.

Por razones prácticas la ración de las ovejas debe consistir en pasturas casi todo el año con heno bien curados y otros forrajes disponibles el resto del año más una limitada asignación de granos en ciertas condiciones.

El heno de buena calidad secado al sol y las pasturas succulentas no solamente proporcionan la mayoría de las proteínas necesarias sino que también son excelentes fuentes de calcio y vitamina, en especial vitaminas A y D. En lo que respecta al ganado para engorde la terminación de los corderos requiere una abundante provisión de grano.

1 4 1 1 Requerimientos nutritivos específicos del ovino

De idéntico modo que para otras clases de ganado estas necesidades pueden clasificarse en proteicas, energéticas, minerales, vitamínicas y agua. Cada una de ellas debe de ser tratada de manera separada.

La temperatura ambiental, la velocidad del viento, la humedad relativa y la radiación solar son factores que tienen una fuerte influencia sobre el consumo voluntario de los alimentos, la digestibilidad, el metabolismo y la disipación de calor corporal (Romano y Martínez, 2010).

En animales rumiantes al bajar la temperatura ambiental de 10°C a 0°C el consumo de alimentos se incrementa 5-3% pero disminuye su digestibilidad en 0-31% por cada grado Celsius. En los ambientes cálidos los requerimientos energéticos para mantenimiento aumentan debido al incremento de la respiración, la sudoración y el efecto calorígeno hormonal (Romano y Martínez, 2010).

Ademas de los efectos directos del calor sobre la produccion y calidad de los forrajes sobre la presencia de competidores como las malezas plagas y parasitos

1 4 2 Estado de salud de los ovinos

El productor debe estar al tanto de la interrelacion que existe entre las enfermedades infecciosas y parasitarias de los ovinos Ya que muchas de ellas son transmisibles entre especies y al hombre

La prevencion de enfermedades en ovinos requiere alimentarlos adecuadamente proveerlos de abundante cantidad de agua limpia y fresca, evitarles hacinamientos arbitrar los medios para que efectuen suficiente espacio y colocarlos en lugares limpios secos y bien ventilados

Uno de los requisitos fundamentales es el perfecto conocimiento de estas medidas preventivas Tambien se debe tener nocion adecuada de las enfermedades mas habituales para reconocer y proceder a consultar al veterinario

En los tropicos se presentan muchas enfermedades que merman la produccion entre las mas comunes se pueden mencionar neumonia, fiebre aftosa, parasitos y otras El parasitismo elevado que se presenta en ovinos debilita a los animales y permite la transmision de otras enfermedades

(Mendives 2007)

Muchas infecciones causadas por hemoplasmas son clinicamente inaparentes pero en algunas especies pueden causar enfermedades evidentes aun en huespedes inmunocompetentes La enfermedad clinica incluye anemia hemolitica de leve a severa y es usualmente fatal en gatos ratones cerdos y corderos Otra caracteristica es que pueden persistir por años infectando animales en forma latente sin producir enfermedad

Si se somete a los animales infectados a esplenectomia, estres u otros factores predisponentes usualmente se provoca la aparicion de numerosas bacterias en sangre e inclusive signos clinicos Tambien pueden infectar cronicamente tejidos de órganos reproductivos aunque esta posibilidad no esta bien investigada (Pereyra N et al 2005)

1 4 2 1 Vectores biologicos

Diferentes especies de artropodos tienen importancia veterinaria por causar enfermedades transmitir organismos patogenos a los animales y generar perdidas economicas significativas

(Cortés Vecino J A. 2011)

1 4 2 1 1 Garrapatas

Las garrapatas son ectoparasitos hematofagos obligados practicamente de todos los vertebrados terrestres (principalmente mamiferos) aves reptiles y algunos anfibios y aunque han sido considerados parasitos cosmopolitas numerosas especies estan restringidas a regiones (habitats) especificas

Para agrupar taxonomicamente a las garrapatas se han reconocido tres familias (Ixodidae Argasidae y Nuttalliellidae) dentro de la super familia Ixodoidea, a su vez incluida dentro del suborden Ixodidae No obstante la clasificacion taxonomica de estos artropodos y la ubicacion de algunas especies dentro de un taxon determinado con frecuencia han generado debates

Las herramientas moleculares actuales han permitido grandes avances cientificos en el entendimiento de las relaciones filogeneticas de las garrapatas

El ciclo de vida de las garrapatas incluye cuatro estadios huevo larva, ninfa y adulto Las garrapatas ixodidas solamente presentan un estadio de ninfa, en tanto que las garrapatas argasidas tienen dos o mas estadios de ninfa. El ciclo de vida de las garrapatas ixodidas puede ser de uno hasta tres huespedes

Las garrapatas poseen importancia sanitaria y economica debido al daño directo que causan al alimentarse para extraer sangre de su huesped, a la transmision de microorganismos patogenos como bacterias (Rickettsias) protozoarios virus hongos nematodos (Experimentalmente) y a la inoculacion de sustancias toxicas a su huesped

Estan consideradas como el segundo grupo de vectores despues de los mosquitos de importancia en la transmision de enfermedades infecciosas a humanos y animales en el ambito mundial

La capacidad vectorial de las garrapatas de la familia Ixodidae se ve favorecida por varios aspectos En primer lugar se alimentan por periodos relativamente largos durante los cuales permanecen firmemente adheridas al huesped y no se sueltan fácilmente En segunda instancia, la picadura, usualmente indolora, pasa desapercibida hasta que la garrapata se ingurgita completamente de sangre

Como tercer punto el ambiente en el intestino medio de las garrapatas es menos hostil que el de insectos hematofagos ya que poseen proteasas intracelulares en consecuencia, los patógenos ingeridos no están expuestos directamente a la acción proteolítica de estas enzimas

Esta característica les da ventajas como transmisores de agentes patógenos y ubica a las garrapatas en los artrópodos que mayor cantidad de organismos transmiten. (Cortés Vecino J A. 2011)

Melophagus ovinus conocido como falsa garrapata es un insecto de la Familia *Hippoboscidae* (díptero aptero) que hace vida parasitaria en forma permanente y obligada principalmente en ovinos. Toda su vida transcurre en el vellón, y la transmisión ocurre por contacto directo entre los animales

El ciclo biológico tiene una duración variable de 24 a 36 días relativamente largo en comparación con los ciclos de otros ectoparásitos de los laneros. Es hematofago estricto y la sangre constituye su única ingesta (Olaechea, F Corley J Larroza, M Raffo F & Cabrera, R. 2006)

Melophagus ovinus es un parásito de frecuente aparición en los ovinos de distintos países sobre todo de las áreas templadas y frías (Olaechea, F V Larroza, M Cabrera, R. & Raffo Y 2007)

1 4 2 1 2 Piojos y Acaros

Los piojos que afectan a estas especies son diversos e incluyen a los masticadores *Bovicola ovis* (ovejas), *Bovicola crassipes* (cabras Angora) *Bovicola caprae* (cabras y ovejas) y *Bovicola limbatus* y los piojos chupadores *Linognathus setulosus* (ovejas) *Linognathus stenopsis* (cabras), *Linognathus africanus* (ovejas y cabras) *Linognathus vituli* (cabras) y el piojo podal (*Linognathus pedalis*) (Gutiérrez, D et al 2010)

Cinco tipos de ácaros causantes de sarnas se describen en ovinos y caprinos *Psoroptes ovis* es el causante de la sarna psoroptica que afecta a ovinos *Sarcoptes scabiei* da origen a la sarna sarcoptica que afecta a ovinos y caprinos la sarna corioptica es ocasionada por *Chorioptes ovis* en ovejas (Gutiérrez, D et al 2010)

1 4 2 1.3 Moscas

De los problemas causados por las moscas se asocia las causantes de miasis primarias y secundarias particularmente el gusano nasal *O ovis* una de las miasis primarias mas importantes en los ovinos y caprinos sin dejar de considerar al gusano barrenador *Cochliomyia hominivorax* prevalente en Sudamerica. Dentro de los dípteros hematófagos se destacan la mosca brava o del establo *Stomoxys calcitrans* (Gutiérrez, D et al 2010)

1 4 2 1 4 Mosquitos

Hasta ahora se han comprobado las especies de mosquitos *Aedes camptorhynchus* y *Culex annulirostris* como vectores de este microorganismo (Aguirre D H. et al. 2009)

1 4 2 2 Anemia por *Mycoplasma ovis*

La infección por *Mycoplasma ovis* es generalmente asintomática, aunque se han descrito cuadros clínicos de curso crónico y agudo. La forma crónica se caracteriza por anemia moderada, fatiga y menor producción de carne y lana. En animales portadores la anemia puede eventualmente acentuarse por estrés, inmunosupresión o enfermedades concurrentes. La forma aguda cursa con fiebre, anemia grave, ictericia, depresión, pérdida de peso y muerte (Aguirre D H. et al 2009). Este hemoparásito produce una anemia hemolítica regenerativa. Se reduce la vida media de los eritrocitos debido a un incremento del ritmo de destrucción de los mismos. La hemólisis puede ser resultado de un defecto intrínseco en los eritrocitos o de un defecto microvascular del lecho por donde circulan los eritrocitos. Como resultado se da la lisis de los glóbulos rojos en el espacio intravascular o extravascular que pueden desembocar en ictericia o hemoglobinuria (M K Cynthia, 2007 "Manual MERCK de veterinaria")

1 5 *Mycoplasma ovis*

Es una bacteria pleomorfa y un parasito obligado Esta bacteria se transmite por artropodos hematofagos y por fomites Hasta ahora son pocas las especies de vector comprobadas dentro de las cuales estan incluidas garrapatas (*Haemaphysalis plumbeum* y *Rhipicephalus bursa*) y mosquitos (*Aedes camptorhynhus* y *Culex annulirostris*) (Aguirre D H. et al 2009)

Mycoplasma ovis se puede transmitir también de manera artificial por el uso de instrumental comun en distintas practicas ganaderas como vacunaciones esquila o aplicacion de caravanas (Aguirre D H. et al 2009)

1 5 1 Diagnostico del *Mycoplasma ovis*

Este microorganismo es un parasito obligado de los hematies de ovinos y caprinos no cultivable en medios artificiales

Ha sido observado con la coloracion de Giemsa en frotis de sangre en la superficie de los eritrocitos como pequeños organismos basofilos cocoides de 0 5 μm a 1 0 μm de diametro Tambien por fluorescencia a traves de la tincion de frotis con Naranja de Acridina (Aguirre D H. et al 2009)

La deteccion e identificacion de este microorganismo se han realizado con pruebas bioquimicas enzimaticas tincion fluorescente del ADN y las tecnicas moleculares dentro de las que se encuentran la Hibridacion de Acido Nucleicos (HAN) y la Reaccion en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Yenney Hernández et al 2009)

Los micoplasmas como características distintivas carecen de pared celular lo cual ha permitido desarrollar diferentes metodos de extraccion de ADN mucho mas sencillos basados en choques termicos o ruptura mecanica, para ser empleados en los ensayos de PCR, ademas de tener en cuenta las grandes ventajas que presenta esta tecnica como lo son su gran sensibilidad especificidad y rapidez en el diagnostico

Esta tecnica, al igual que otras utilizadas para la deteccion de micoplasmas es aprobada por organismos reguladores internacionales en la Farmacopea Europea 2007 y el Manual de OIE (Organizacion mundial de sanidad animal) (Yenney Hernández et al 2009)

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio realizado es de tipo descriptivo transversal donde se diagnosticó el microorganismo en una de las fincas dedicadas a la ovinocultura ubicada dentro de la provincia de Panamá. El periodo del estudio fue de 21 días los cuales incluyen el periodo de toma de muestra y registro de los parámetros ambientales.

La toma de muestra fue determinada por el personal del Departamento de Enfermedades Transmisibles y Salud pública de la Facultad de Medicina Veterinaria (**Figura 1**) el cual realizó la extracción de sangre a un total de 71 ovinos con cuadro anémico dentro de la programación descrita en el **Cuadro 1**.

CUADRO 1 Programación de la toma de muestras del personal de la Facultad de medicina veterinaria.			
Fecha de muestreo	Sitio de Muestreo		Numero de muestras
6 de mayo de 2014	Finca nº1	Panamá – Tocumen	20
10 de junio de 2014	Finca nº2	Panamá – Arraiján	12
4 de septiembre de 2014	Finca nº3	Panamá – Arraiján	7
3 de octubre de 2014	Finca nº4	Panamá – Capira	10
13 de noviembre de 2014	Finca nº5	Panamá – Chorrera	10
6 de diciembre de 2014	Finca nº6	Panamá – Chame	12



FIGURA 1. Toma de muestra de sangre en la finca #4. Personal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Panamá tomando las muestras de sangre de los ovinos.

2 1 TOMA DE LAS MUESTRAS DE SANGRE (D B Morton, et al 1993)

Para la toma de la muestra de sangre se hizo una extracción ubicando la vena yugular del cuello del pequeño rumiante. De la misma, se tomó una cantidad de 4mL en un tubo con citrato de sodio como anticoagulante por elección para conservar las muestras previo al análisis molecular. Las muestras de sangre extraídas se conservaron y transportaron al laboratorio a una temperatura de 4°C.

2 2 FROTIS SANGUINEO (Murray P R et al 2003)

Previo a la preparación de los frotis con las muestras de sangre mezclamos suavemente los tubos por inversión de 5 a 7 veces hasta homogenizar la sangre. Se rotularon en los portaobjetos con lápiz de diamante los números de las muestras registradas. Seguido se colocó una pequeña gota de sangre (0.2 ml aproximadamente) en un extremo de la placa, la cual se extendió con otro portaobjeto de bordes lisos y formando un ángulo de 45° grados con un movimiento continuo y hacia adelante. Una vez hecho el frotis se deja secar a temperatura ambiente. Se hicieron las placas por duplicado para estudio diferencial de células con las tinciones de Giemsa y Naranja de Acridina.

2 3 TINCION DE LAS MUESTRAS

2.3 1 Tincion con GIEMSA

Dentro de su composición química, la solución de Giemsa está compuesta por dos tipos de tinte: Eosina como tinte ácido y Azul de Metileno como tinte básico. Ambos colorantes se encuentran en estado no ionizado mientras se mantienen en solución de alcohol metílico, pero al añadir agua, se ionizan y se unen selectivamente a los constituyentes celulares precipitando como sales insolubles. Los componentes celulares de naturaleza aniónica (ácida) se unen selectivamente a los tintes catiónicos, tiñéndose en variados tonos de azul. Estos componentes son llamados basófilos (ADN, mitocondrias, ribosomas y citoplasma de células ricas en ARN).

Esas son las granulaciones que observamos en los glóbulos rojos que de manera natural no tienen ácidos nucleicos. (ARP 1992)

Para poder preparar este tinte se necesito obtenerla solucion madre del tinte Giemsa, agregando 1 gramo de Colorante GIEMSA (constituido por una mezcla de azul de metileno y eosina) se diluyo el colorante agregando 54mL de Glicerol y 84mL de Metanol al 95% Se mezclo y deajo en la incubadora a 37°C por 24 horas para su maduracion

Esta preparacion se diluyo con agua destilada o solucion amortiguadora en una proporcion de 1 20 fue filtrada y colocada en vasos Coplin antes de usarla.

La placa fue fijada en metanol durante 1 minuto se dejó secar fue teñida en los vasos Coplin durante 35 minutos y se observo la placa teñida al microscopio optico (D B Morton, et al 1993)

2.3 2 Tincion con NARANJA DE ACRIDINA

En las placas teñidas con Naranja de Acridina, pudimos observar fluorescencia, determinandose la presencia de acidos nucleicos (ADN) El tinte se intercala entre estas biomoleculas

Cuando está asociado al ADN el Naranja de Acridina es espectralmente similar a la fluoresceina, que absorbe ciertas longitudes de onda y emite luz fluorescente de longitud de onda larga. Sin embargo este principio es especifico para determinar la presencia de ADN mas no define cual es el microorganismo Es posible la aparicion de falsos positivos en ambas tinciones por los globulos rojos que no han llegado a su maduracion conservando aun restos de ADN (Cuerpos de *Howell Yolly*) (ARP 1992)

Para preparar la solucion madre se agrego 1g del tinte Naranja de Acridina en 100mL de agua destilada. Seguido se preparo la solución de trabajo añadiendo 0.5mL de la solucion madre a 5mL de buffer acetato pH 4 y se fijo la placa con alcohol metilico durante 1 minuto

El frotis fue teñido con Naranja de Acridina (solucion de trabajo) durante dos minutos y se observo la placa en el microscopio con luz ultravioleta (Murray P R. et al, 2003)

2 4 EXTRACCION DE ADN

Las muestras de sangre con anticoagulante fueron sometidas a extraccion del ADN mediante el KIT de extraccion de ADN *DNeasy Blood and Tissue* kit de QIAGEN Previo al uso de este Kit de extraccion se realizo el lavado con buffer fosfato salino (PBS) de las celulas de las muestras de sangre que a continuacion se detalla.

2 4 1 Lavado de celulas con PBS (Laboratorio de Genómica Viral y Humana – Facultad de Medicina – Universidad Autónoma de Potosí mayo del 2008)

- Para preparar el PBS se agrego una tableta tampon - PBS lista para una disolucion de 100mL se esterilizo dicha disolucion en una autoclave durante 15 minutos a 121°C y se agrego el PBS en viales de 25mL esteriles manteniendo la esterilidad del mismo
- Se dejó reposar la muestra de sangre en el tubo con citrato y se elimino el plasma
- Se agregaron en el tubo con citrato de 2mL a 3mL de PBS esteril para lavar los globulos rojos se mezclo por inversion y centrifugo a 2000 rpm por 5 minutos
- Se decanto el sobrenadante y se agregaron de 2mL a 3mL de PBS para resuspender y se centrifugo a 2000 rpm por 5 minutos
- Se decanto el sobrenadante y se procedio a la extraccion del ADN
- Se conservaron a -20°C aquellas muestras que no fueron analizadas el mismo dia.

2 4 2 Extraccion de ADN

Procedimiento para la extraccion de ADN (Nacimiento A. et al 2011)

- Se agregaron 20 µL de la muestra de sangre del tubo con citrato en un tubo para centrifugacion (microcentrifugacion) de 1.5ml o 2ml y se ajusto el volumen a 220 µL con PBS (Laboratorio de Genómica Viral y Humana – Facultad de Medicina – Universidad Autónoma de Potosí Mayo del 2008)
- Se añadieron 200 µL de Buffer AL se mezclo con el vortex e incubaron las muestras a 56°C por 10 minutos
- Se añadieron 200 µL de etanol (96% a 100%) y se mezclo con el vortex
- Se coloco la mezcla a una columna de centrifugacion de 2ml se centrifugo por un minuto a >6000xg (8000rpm) y se descarto el tubo de coleccion

- Se colocó la columna de centrifugación en un nuevo tubo de colección de 2ml se añadió buffer AW1 se centrifugó por un minuto a $>6000\times g$ y se descartó el tubo de colección
- Se colocó la columna de centrifugación en un tubo de recogida de 2 ml nuevo se añadió 500 ml de buffer AW2 y centrifugó durante 3 minutos a $20\,000\times g$ (14 000 rpm) Se desechó el tubo de recogida
- La columna de centrifugación fue transferida a un tubo de microcentrifugación de 1.5mL o 2mL
- El ADN fue eluido por adición de 200 μ L buffer AE en el centro de la membrana de la columna de centrifugación Se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente (15°C 25°C) Se centrifugó durante 1 minuto a $>6000\times g$ (8000 rpm)
- Se mantuvo las muestras a una temperatura de -80 ° C para proceder a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con los cebadores genéricos

2.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (Molina F C Dra. Año 2012)

Para la PCR se preparó la mezcla en base a los reactivos con la correspondiente cantidad 10 μ l del Master mix (Taq PCR Master mix Qiagen) 1 μ l del Primer 340F 1 μ l Primer 764R, 2 μ l de Agua de grado molecular y 6 μ l ADN extraído - muestra Para la amplificación inicialmente se calculó el volumen final multiplicando el volumen de los reactivos de la mezcla antes mencionado por la cantidad de muestras que se iban a amplificar

Los cebadores utilizados de *Mycoplasma spp* seguían las siguientes secuencias

- Cebador 340F CCA TAT TCC TAC GGG AAG CA
- Cebador 764R TCA GTT ATA TCC CAG GTA CTC GCC

La calibración del termociclador para *Mycoplasma ovis* fue la siguiente

- Desnaturalización a 95°C por 2 minutos
- 35 ciclos de 95°C por 20 segundos
- 35 ciclos de 57°C por 30 segundos
- 35 ciclos de extensión del ADN a 72°C por 30 segundos
- Extensión final del ADN a 72°C por 5 minutos
- La muestra se conserva a 4°C

A los productos de la PCR obtenidos se les practico electroforesis en gel de agarosa, para observar las bandas en las muestras y de esta manera comprobar la presencia del *Mycoplasma ovis*

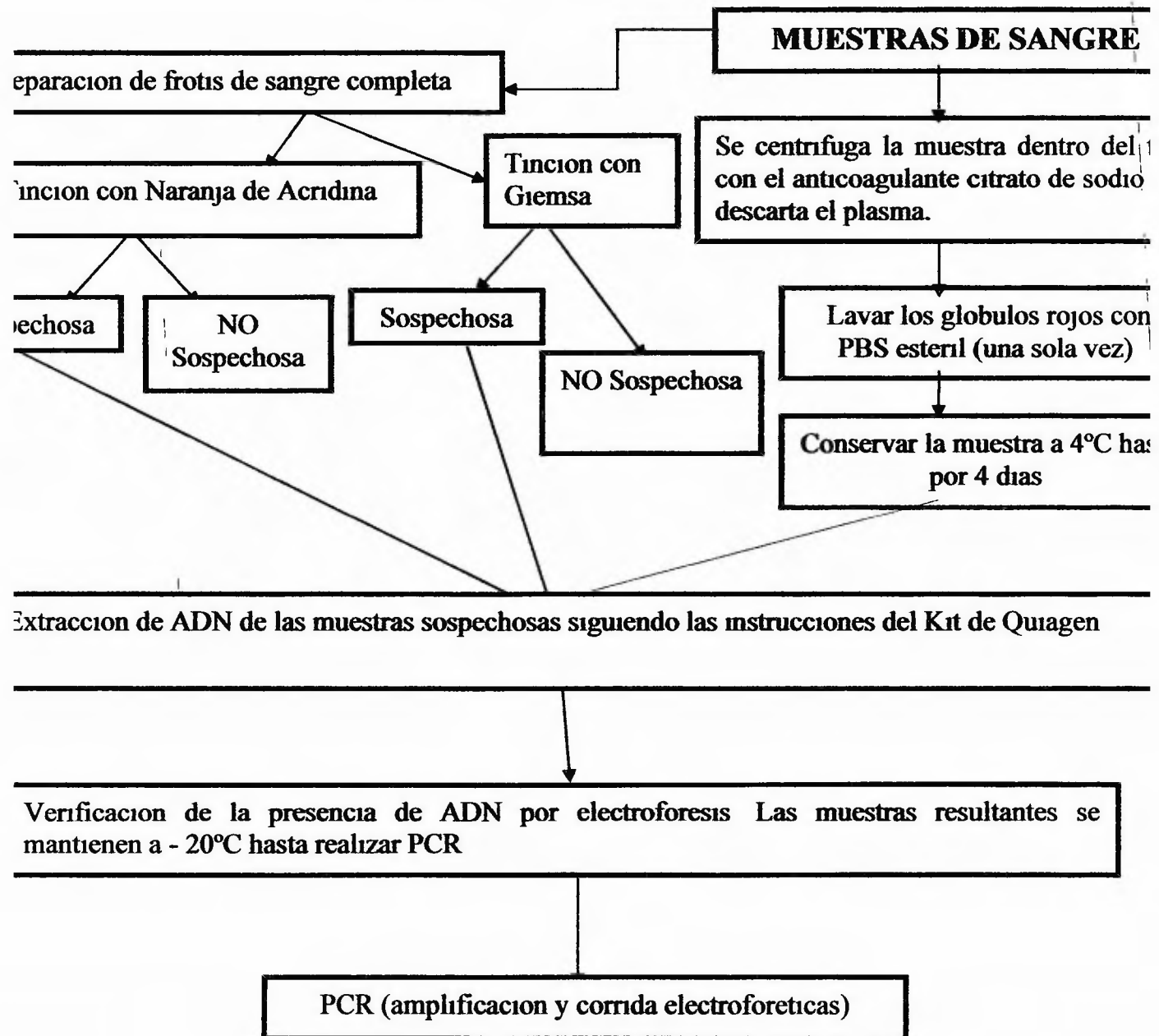
2.6 ELECTROFORESIS (Duque P D 2009)

Para preparar el gel de agarosa se diluyo 0.75g de agarosa en 50mL de tampon de electroforesis TBE 1X y se calento la disolucion

Luego se le añadio 2.5µL de bromuro de etidio al estar el gel de agarosa a una temperatura de 60°C y se añadió al molde un peine para que el gel forme los pocillos donde se colocaran las muestras. Después que el gel se solidifico se colocó en la cámara de electroforesis. Dentro de la cámara, el gel se sumergio añadiendo aproximadamente 200mL del buffer de electroforesis o TBE 1X. En cada pocillo se colocaron 7µL de la muestra (ADN extraído) y 3 µL del tampon de carga (loading buffer).

Se le aplicó a la cámara de electroforesis una corriente de 100 voltios durante 30 minutos. Los electrodos positivos y negativos que se disponen de un extremo a otro de la cámara de electroforesis permitieron que las moléculas (ADN extraído de las muestras) pudieran migrar del extremo negativo al extremo positivo.

FLUJOGRAMA DEL TRABAJO



2.7 EVALUACION AMBIENTAL

En el estudio se incluyó la observación de factores ambientales que se han reportado asociados con el posible desarrollo y transmisión del hemoparásito

Se le aplicó una encuesta el 23 abril del 2014 al encargado de la finca para obtener información sobre el número de ovinos, raza y descripción del ambiente (ver en anexo)

➤ Toma de la temperatura y humedad dentro del área

Se utilizó el equipo ArduDrop 1.0 del cual se obtuvieron los distintos tipos de datos ambientales para ser posteriormente analizados. Su principal sensor está diseñado para medir humedad del suelo. Esta humedad, depende en parte de las condiciones meteorológicas por lo que el dispositivo también dispone de distintos sensores para medir temperatura superficial al sol, luminosidad, temperatura ambiente, humedad ambiental y un sensor de intensidad de lluvia (disdrometro) (De Pablo Miguel, et al 2010)

Procedimiento para utilizar el ArduDrop 1.0 (De Pablo Miguel et al 2010)

- La medición se tomó utilizando el dispositivo electrónico ArduDrop 1.0 el cual se colocó en campo abierto con el fin de medir la temperatura y humedad en el ambiente
- Con los datos obtenidos se calculó el índice de confort utilizando la fórmula de índice de temperatura y humedad (ITH) para ovino propuesta por Kelly Bond en 1971 la cual se detalla a continuación (Díazgrandos D 2011) $ITH = T^{\circ}C - [0.55 * (1 - HR)] [T^{\circ}C - 14.4]$
- De los valores obtenidos del cálculo del índice de confort se hizo un análisis estadístico con ayuda del programa GraphPad Prism 6.0 para variables de tipo transversal y registrado de manera aleatoria por el equipo ArduDrop 1.0 durante los 16 días (II Curso básico de Bioestadística. Marzo 2015)

➤ Colecta e identificación de vectores biológicos

Las muestras recolectadas fueron identificadas con claves taxonómicas y en colaboración con el Departamento de Entomología de la Universidad de Panamá.

2.7.1 Mosquitos (Rubio – Palis Y et al Agosto 2007) La captura de los mosquitos se hizo a través de la trampa con luz ultravioleta.

2.7.2 Garrapatas (Rodríguez I, et al 2009) Captura de las garrapatas manualmente sin estropear la estructura bucal y conservada en viales con etanol al 70%

2.7.3 Moscas Se usó trampa casera con cebo preparado y se conservaron las moscas capturadas en un vial con alcohol al 70%

INSUMOS Y EQUIPOS UTILIZADOS PARA LA TOMA DE MUESTRA DE
PARAMETROS AMBIENTALES.

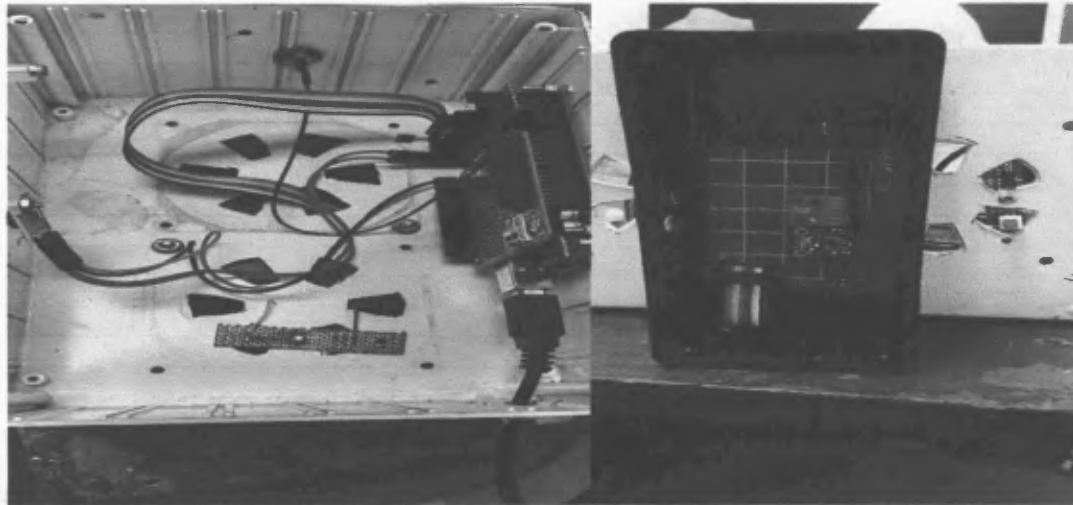


FIGURA 2. Dispositivo electrónico ArduDrop 1.0 utilizado para tomar la temperatura y humedad ambiental.



FIGURA 3. Trampa utilizada para capturar las moscas en la toma de muestra.



FIGURA 4. Trampa de Luz ultravioleta utilizada para capturar los mosquitos.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

Luego de realizar los procedimientos indicados en el capítulo de materiales y métodos se procede a presentar los resultados a continuación

En el microscopio óptico se observa una de las muestras considerada como sospechosa (**Figura 5**) y se señala la granulación basofila en la membrana del eritrocito. En contraste en la **Figura 6** se presenta la imagen de otra de las muestras clasificada como 'NO' sospechosa, donde no se encontró granulación basofila en la membrana del eritrocito.

De las placas teñidas con Naranja de Acridina observadas en el microscopio de luz ultravioleta, se observa en la **Figura 7** la fluorescencia en la membrana del eritrocito que indicaría la presencia de ADN, la cual fue clasificada como sospechosa. Contrario a lo observado en la imagen de una de las muestras (**Figura 8**) no se presenta fluorescencia en la membrana del eritrocito.

En la **Grafica 1** podemos observar la representación de los resultados de las tinciones con Giemsa, donde se comparan las muestras tomadas en las fincas N°1 N°2 N°3 N°4 N°5 y N°6. Se detalla en la gráfica la cantidad de muestras sospechosas y 'NO' sospechosas. De igual forma en la **Grafica 2** se observa la cantidad de muestras sospechosas y 'NO' sospechosas en los respectivos sitios de muestreo de las fincas teñidas con Naranja de Acridina.

En el Anexo en el **Cuadro A.2** se detallan las 41 muestras que fueron seleccionadas como sospechosas con su respectiva identificación.

En la **Figura 9** se observa que en la electroforesis de extracción de ADN de las muestras sospechosas que corresponden a la finca N°4 a saber M4d – 14 M4e – 14 M4h – 14 M4f – 14 y M4a – 14 presentan bandas de la molécula buscada.

En la **Figura 10** de la finca N°5 vemos que las muestras que presentan las bandas de ADN en la electroforesis son M5a – 14 M5b – 14 M5g – 14, M5e – 14 y M5f – 14.

En la **Gráfica 3** se muestran los resultados de las fincas N°5 y N°6 juntas.

En la **Gráfica 4** se observan los resultados de todas las muestras a las que se les realizó la prueba de PCR. Solamente una muestra resultó positiva para *Mycoplasma spp*.

En la **Figura 11** de las 10 muestras analizadas y como resultado de la prueba molecular (PCR), se observa en la electroforesis una sola banda de ADN de 400pb que corresponde a la muestra M4d – 14.

En el anexo se detalla en el **Cuadro A 4** los datos del ITH de las ovejas por día.

De acuerdo a lo recolectado e identificado y utilizando las claves taxonomicas se describe las especies de insectos encontradas en el area

- Mosquitos del genero *Culex spp* (**Figura N°12**)
- Garrapatas del genero *Amblyomma spp* (**Figura N°13**)

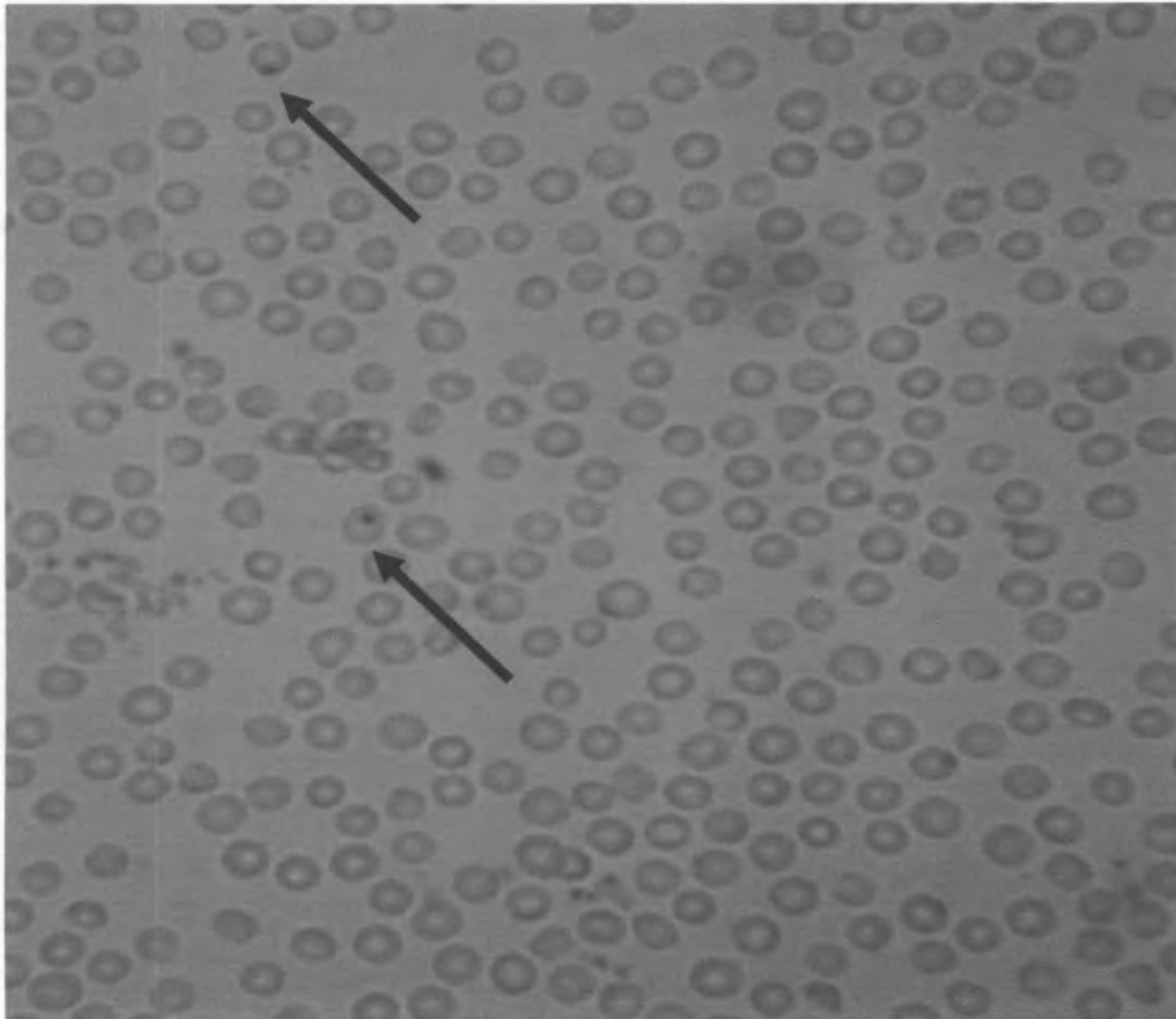


FIGURA 5. Fotografía de la muestra M1t – 14 teñida con GIEMSA. Es clasificada como sospechosa. Las flechas señalan la granulación basófila en la membrana de los eritrocitos.

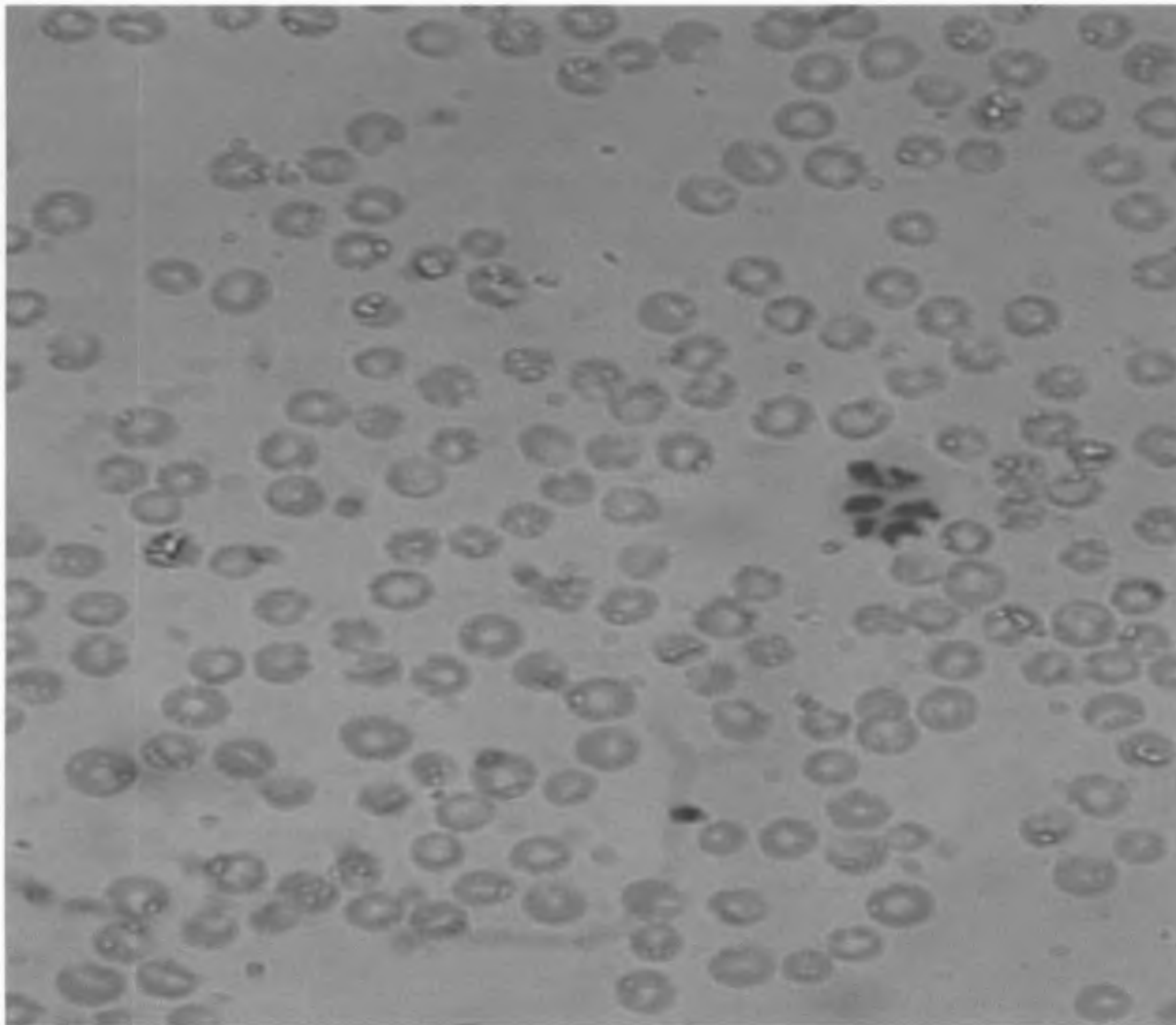


FIGURA 6. Fotografía de la muestra M1j – 14 teñida con GIEMSA. Es clasificada como NO sospechosa. No se observa ninguna granulación en el eritrocito.



FIGURA 7. Fotografía de la muestra M5c – 14 teñida con Naranja de Acridina. Es clasificada como sospechosa. La flecha señala la fluorescencia en la membrana del eritrocito de la granulación basófila.

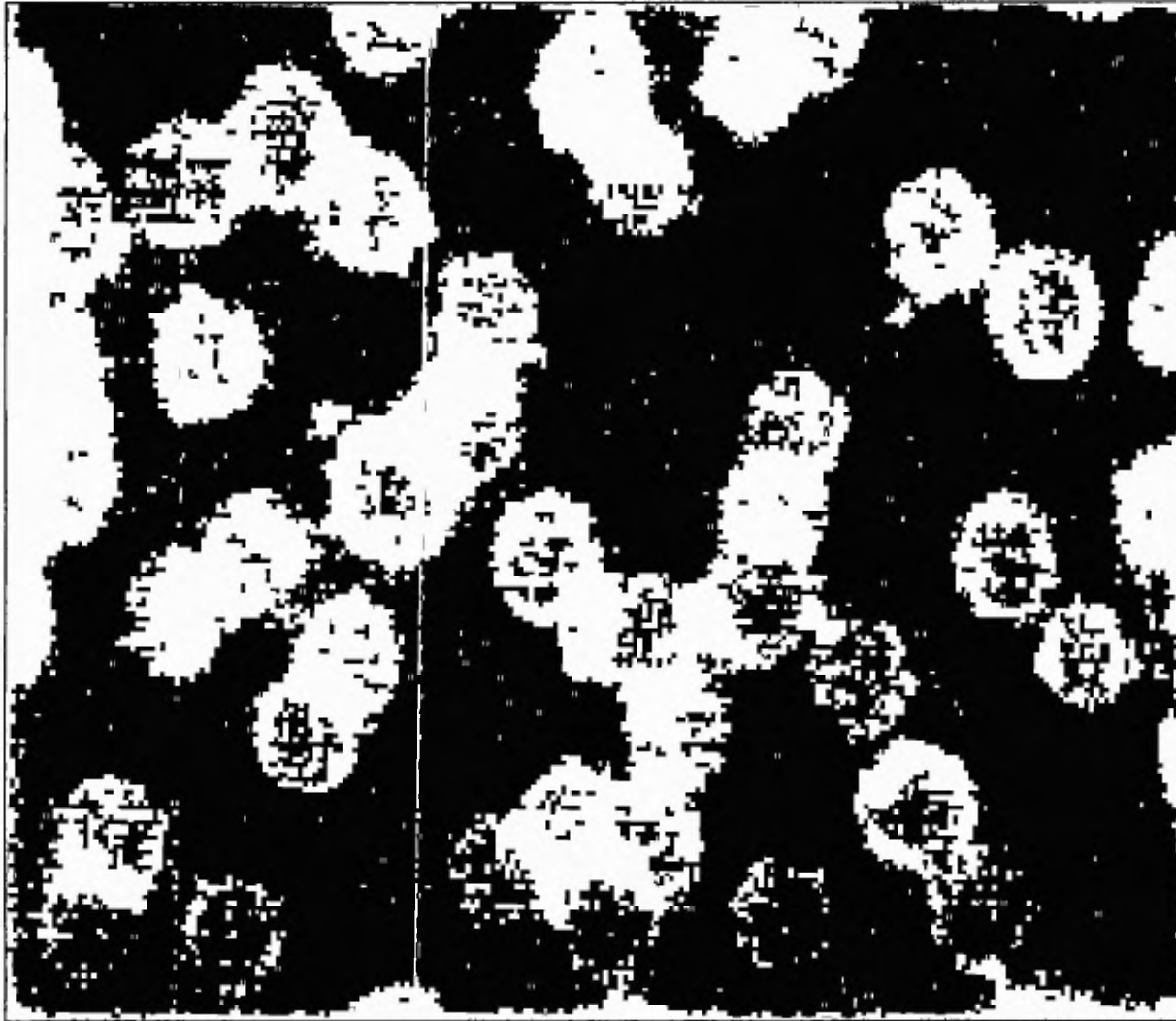


FIGURA 8 Fotografía de la muestra M51 – 14 teñida con Naranja de Acridina Es clasificada como NO sospechosa No se observa fluorescencia en la membrana del eritrocito

Resultados de muestras de sangre teñidas con Giemsa

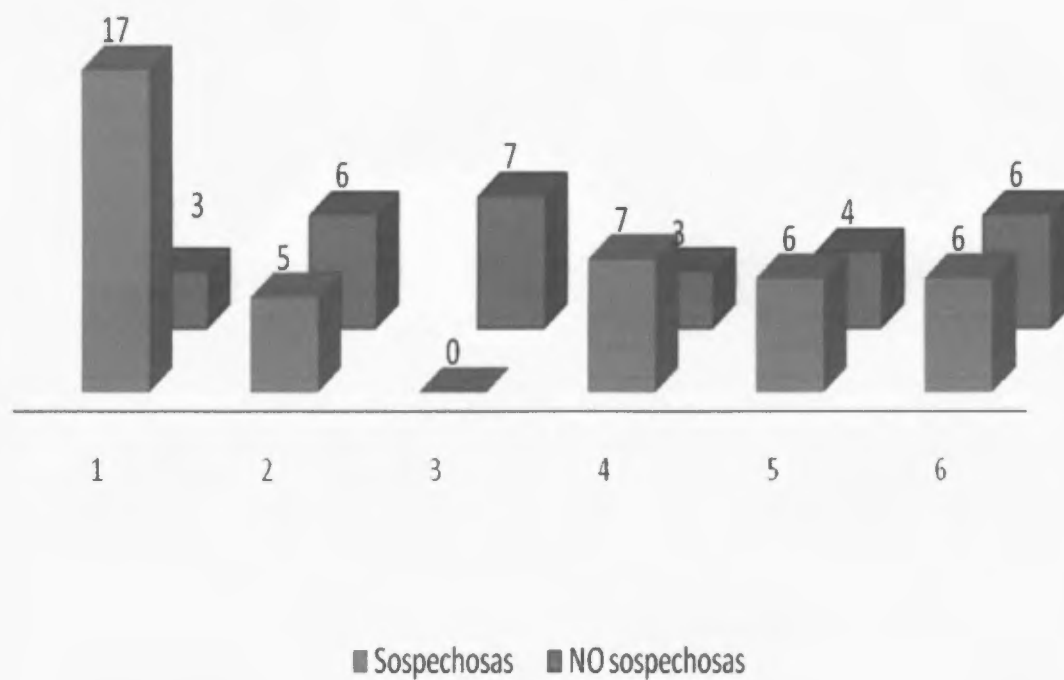


FIGURA 9. Gráfica de los resultados de muestras de sangre teñidas con Giemsa. En esta gráfica se pueden observar los resultados de las muestras de sangre teñidas con Giemsa. Se define la cantidad de aquellas que fueron consideradas como sospechosas, así como las que no lo fueron.

Resultados de muestras de sangre teñidas con Naranja de Acridina

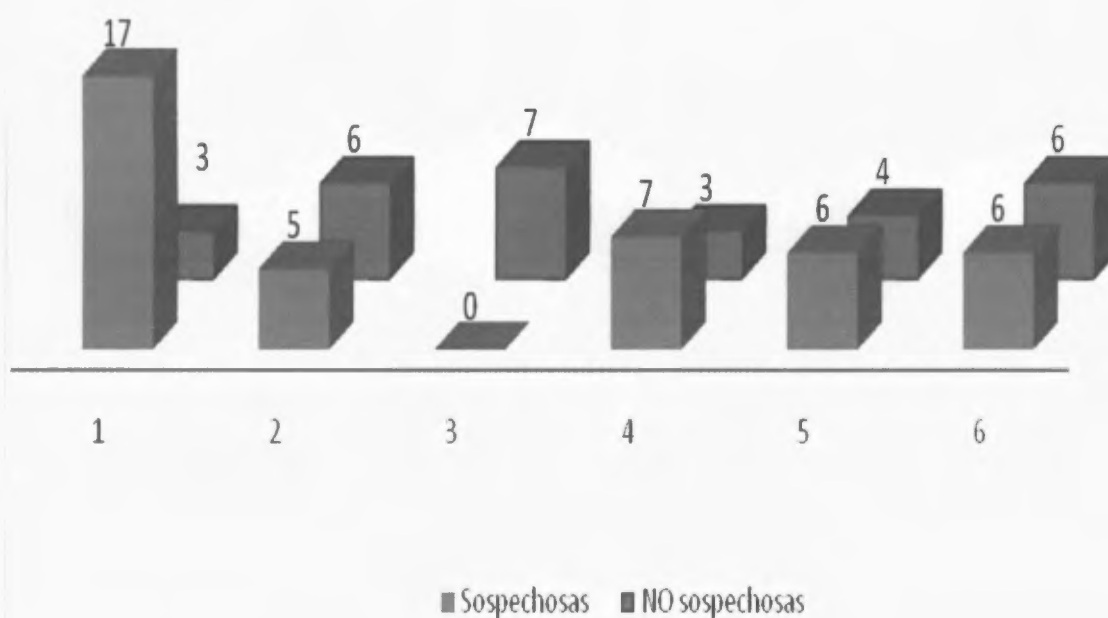


FIGURA 10. Gráfica de los resultados de muestras de sangre teñida con Naranja de Acridina. En esta gráfica se pueden observar los resultados de las muestras de sangre teñidas con Naranja de Acridina. Se define la cantidad de aquellas que fueron consideradas como sospechosas, así como las que no lo fueron.

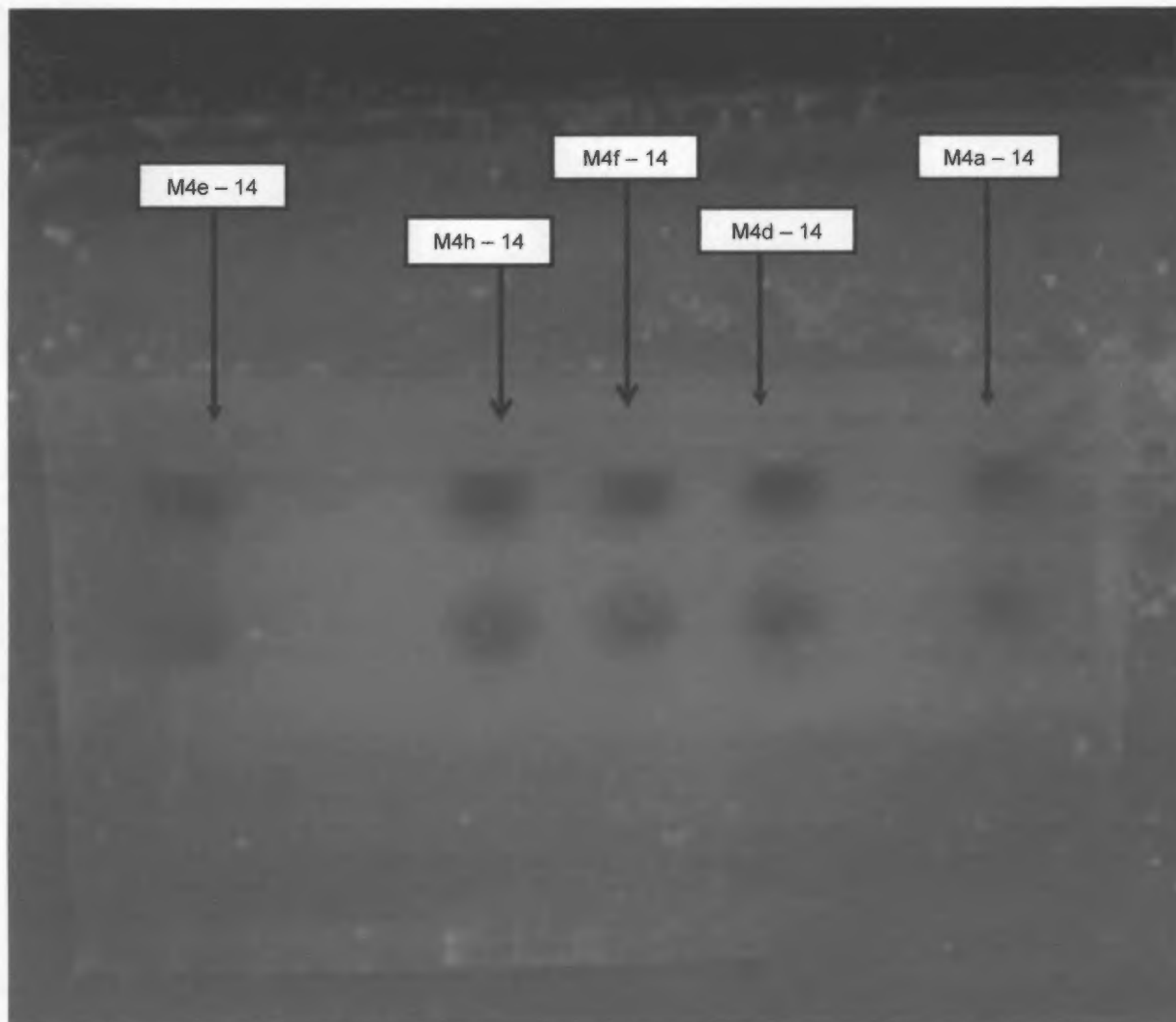


FIGURA 11. Extracción de ADN de las muestras sospechosas en la finca n°4.
Al realizar la electroforesis se tomó fotografía de la extracción de ADN realizada el 8 de octubre del 2014. Se señalan los resultados de las 5 muestras cuyas bandas fueron visibles, correspondiente a la finca n°4.

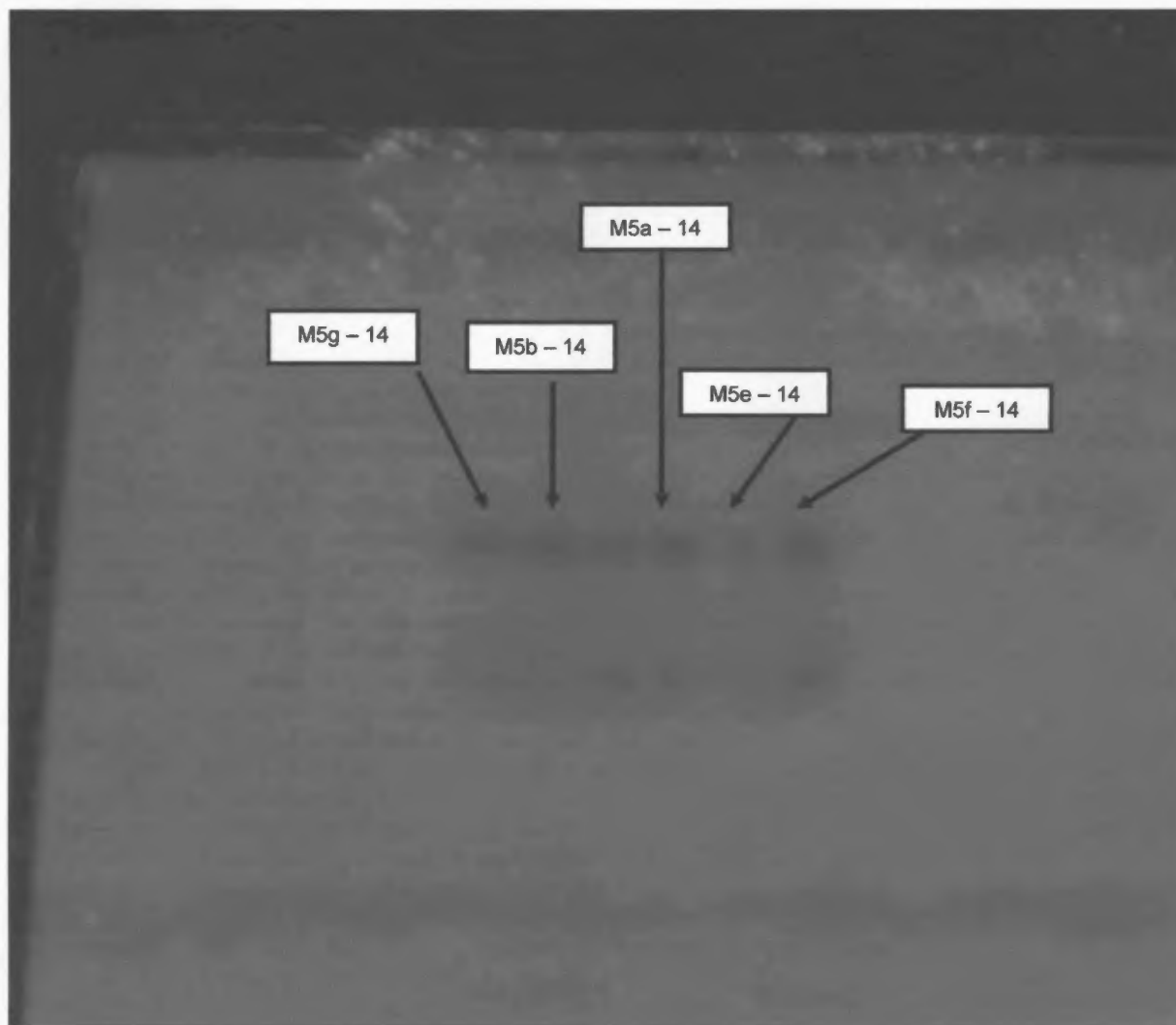


FIGURA 12. Extracción de ADN de las muestras sospechosas en la finca n°. Fotografía de la electroforesis de la extracción de ADN realizada el 13 de noviembre del 2014. Se señalan las 5 muestras cuyas bandas fueron visibles correspondiente a las muestras de la finca n°5.

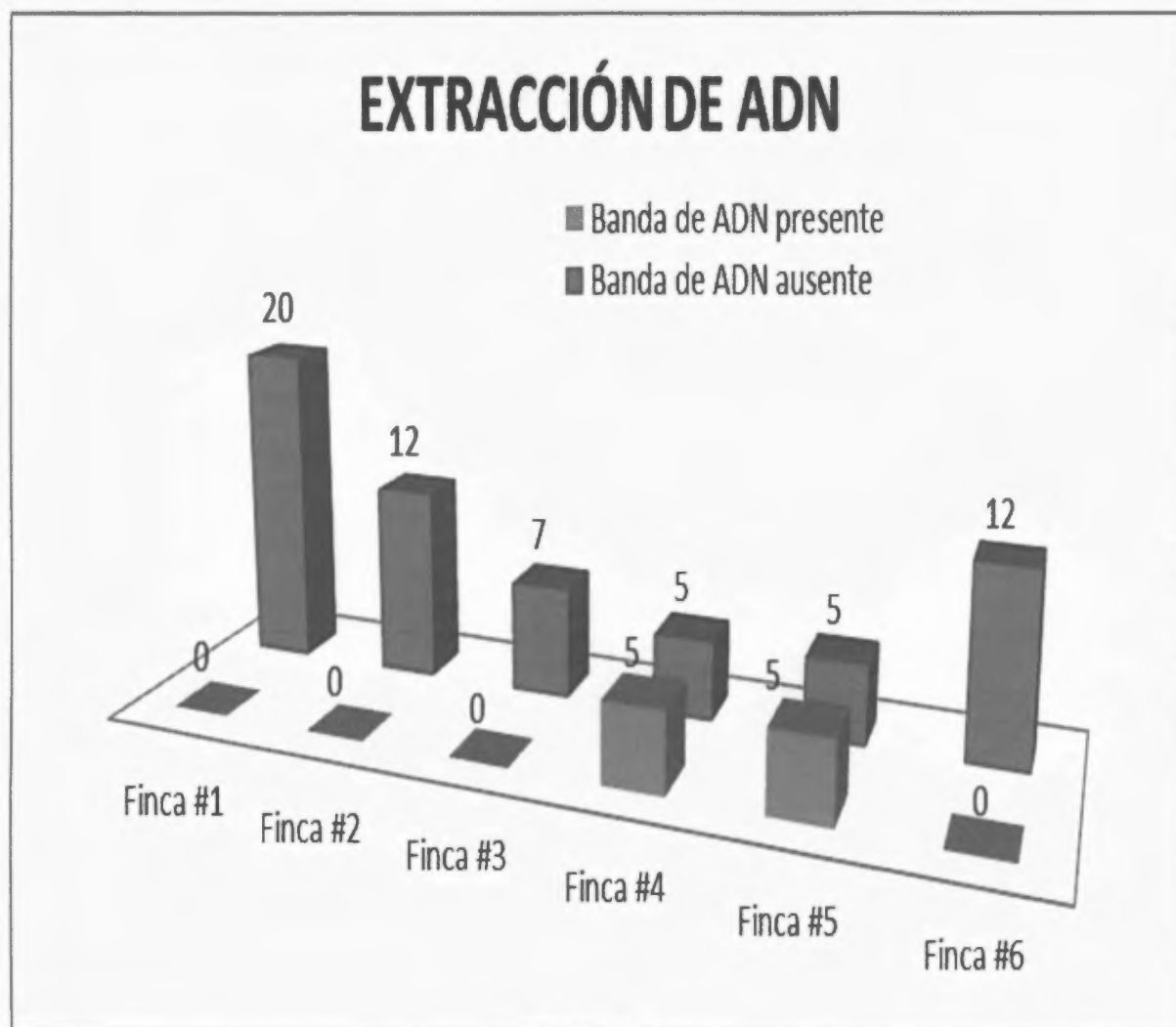


FIGURA 13. Gráfica del resultado de la extracción de ADN a las muestras sospechosas. Destacamos que se observaron 5 bandas de ADN presentes en la finca n°4 y 5 en la finca n°5; la cuales se prepararon para la prueba molecular PCR.

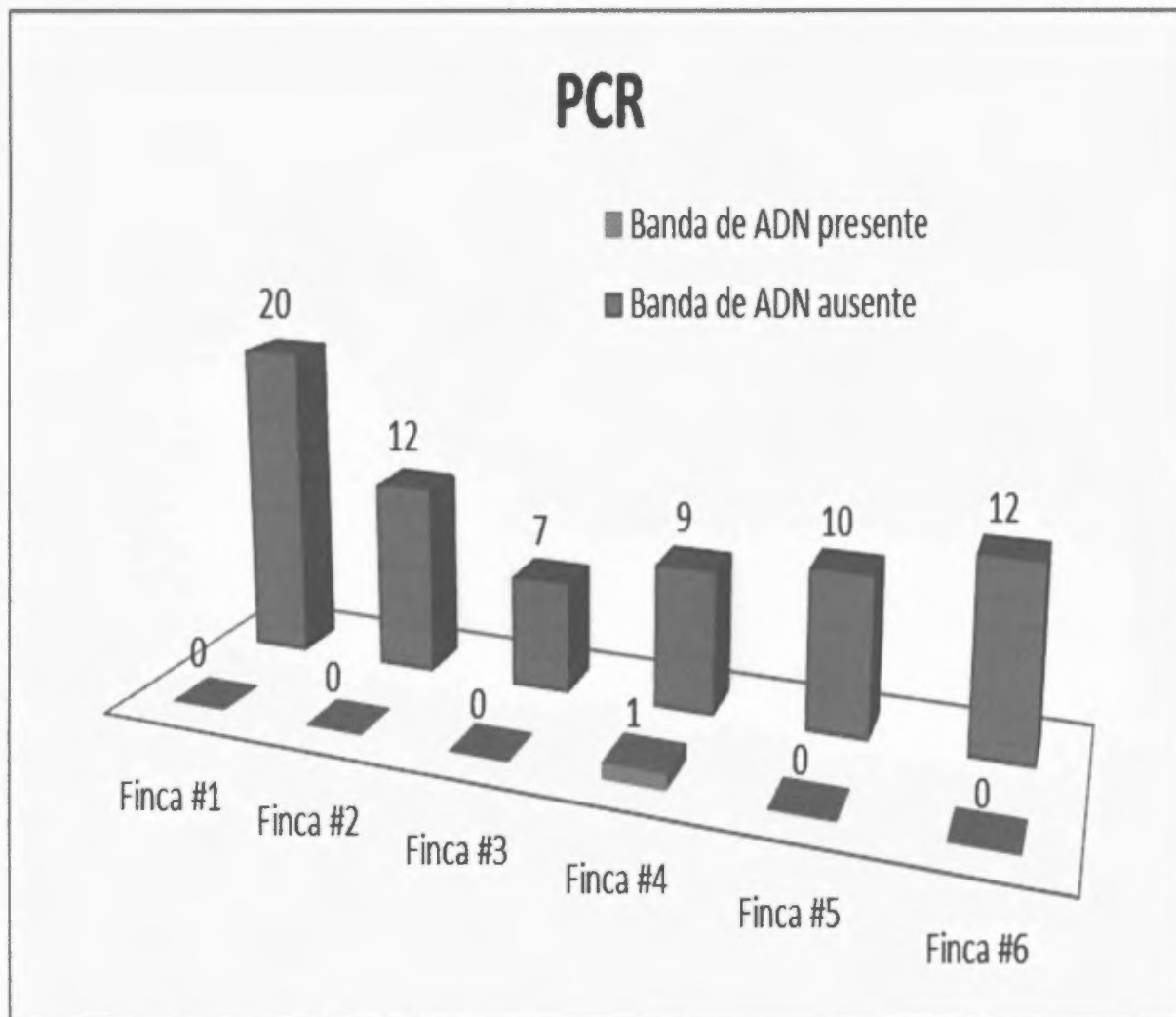


FIGURA 14. Gráfica del resultado de la Amplificación. Se determina el hallazgo de *Mycoplasma ovis* en una de las muestras de la finca nº4, ubicada en la provincia de Panamá, distrito de Capira.

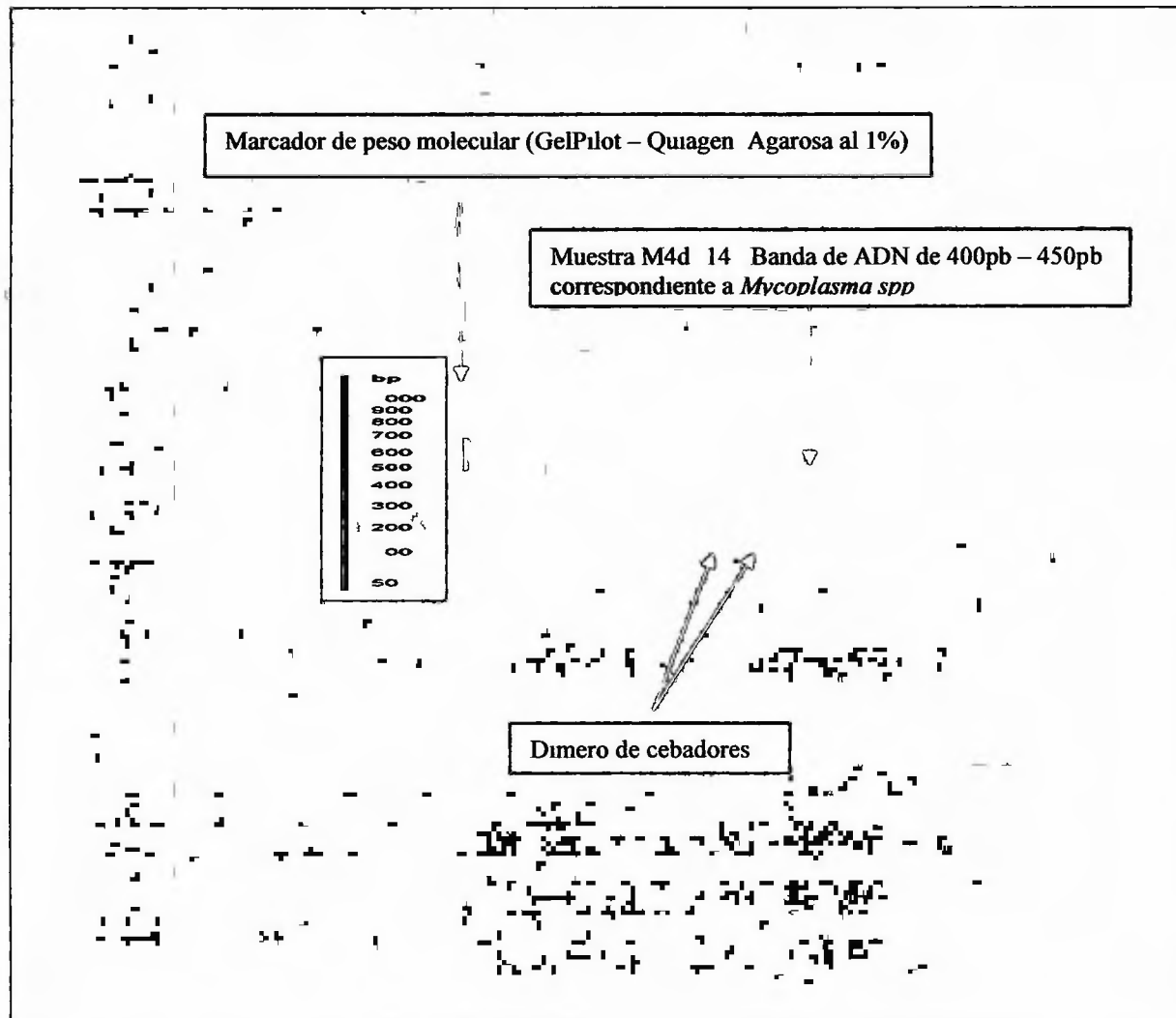


FIGURA 15 Resultado de la prueba molecular PCR muestra positiva M4d – 14
Fotografía tomada después de la corrida de electroforesis de la prueba molecular (PCR) Se observa que la banda de ADN más delgada coincide con la banda del marcador de peso molecular de 400pb

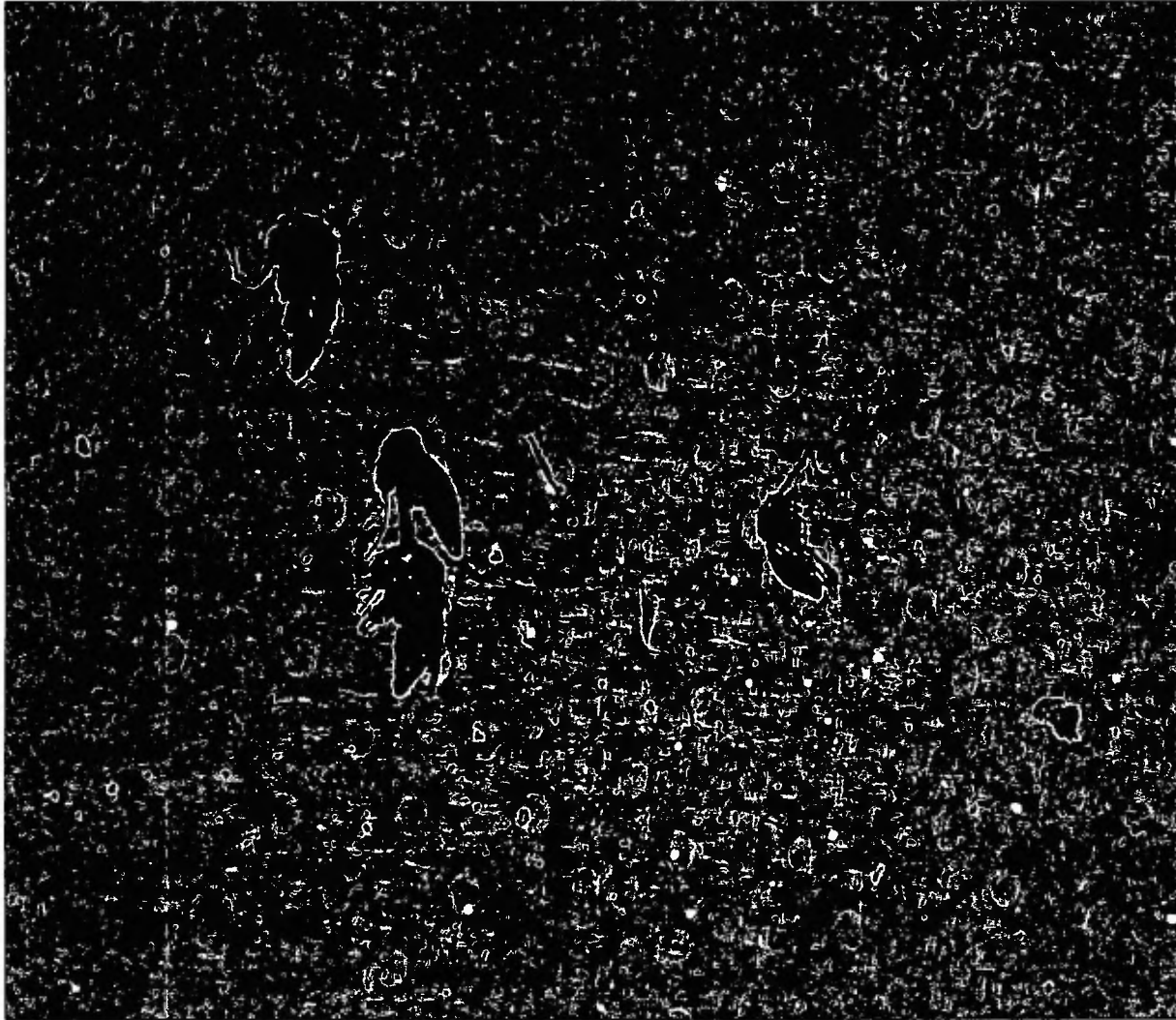


FIGURA 16 Mosquito del genero *Culex spp* Mosquitos capturados con la trampa de luz UV en la Finca N°4, como posible vectorbiológico del hemoparasito

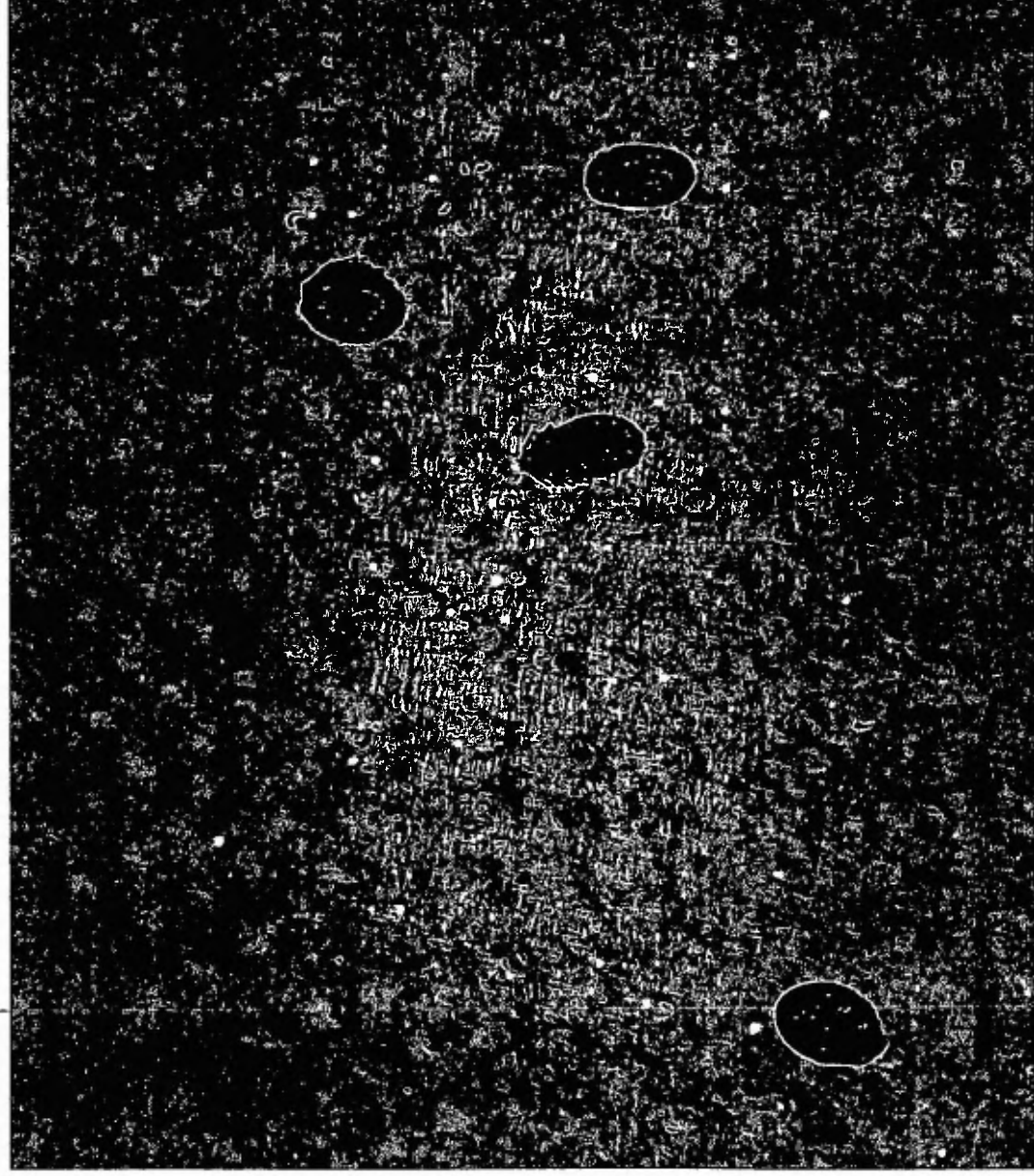


FIGURA 17 Garrapatas del genero *Amblyomma* spp Garrapatas capturadas con la trampa de luz ultravioleta en la Finca N°4, como posible vector biologico del hemoparasito

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

En nuestro estudio los extendidos teñidos fueron tomados de sangre de ovinos que presentaron cuadro anémico el cual fue determinado por personal idóneo de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Panamá. No se halló reporte de decesos dentro de las fincas en el periodo en que fueron tomadas las muestras.

Lo observado en las 71 tinciones de los frotis tanto con Giemsa como con Naranja de Acridina de las muestras de sangre nos indica la sensibilidad y efectividad de estas tinciones en la detección de *Mycoplasma ovis* hemoparásito obligado intracelular de los eritrocitos.

De acuerdo al criterio de selección de cada tinte 41 muestras fueron identificadas con las granulaciones basófilas en la membrana de los eritrocitos mediante la tinción de Giemsa. Con Naranja de Acridina se observó la fluorescencia indicativa de presencia de ADN.

Las dos tinciones coincidieron en sus respectivas lecturas dando información sobre las muestras que eran adecuadas para ser procesadas con la prueba molecular.

Al depurar las 41 muestras lavándolas con PBS y como resultado de la extracción practicada a estas muestras pudimos observar en la electroforesis 10 bandas de ADN. 5 de ellas corresponden a las tomadas en la finca n°4 y las otras 5 en la finca n°5.

Aunque en las fincas n°4 y n°5 se detectó la presencia de ADN, obtuvimos como resultado de la prueba PCR, una muestra de la finca n°4 (M4d – 14) que se amplificó y se evidenció en la electroforesis con una banda de 400pb a 450pb que se corresponde con *Mycoplasma spp* el cual por el hecho de ser hallado en sangre nos confirma la presencia de *Mycoplasma ovis*. Las muestras que no amplificaron en el PCR, pueden ser que se corresponden con otros hemoparásitos como *Babesia spp* o *Anaplasma spp* (Bolívar A. M. 2013).

Con la detección del hemoparásito a través de la prueba molecular PCR, se confirma que esta es un sistema de detección alternativo con alto grado de confiabilidad, ahorros adicionales de tiempo y recursos en el entendimiento de la dinámica de las infecciones hemotrópicas (Bolívar A. M. 2013).

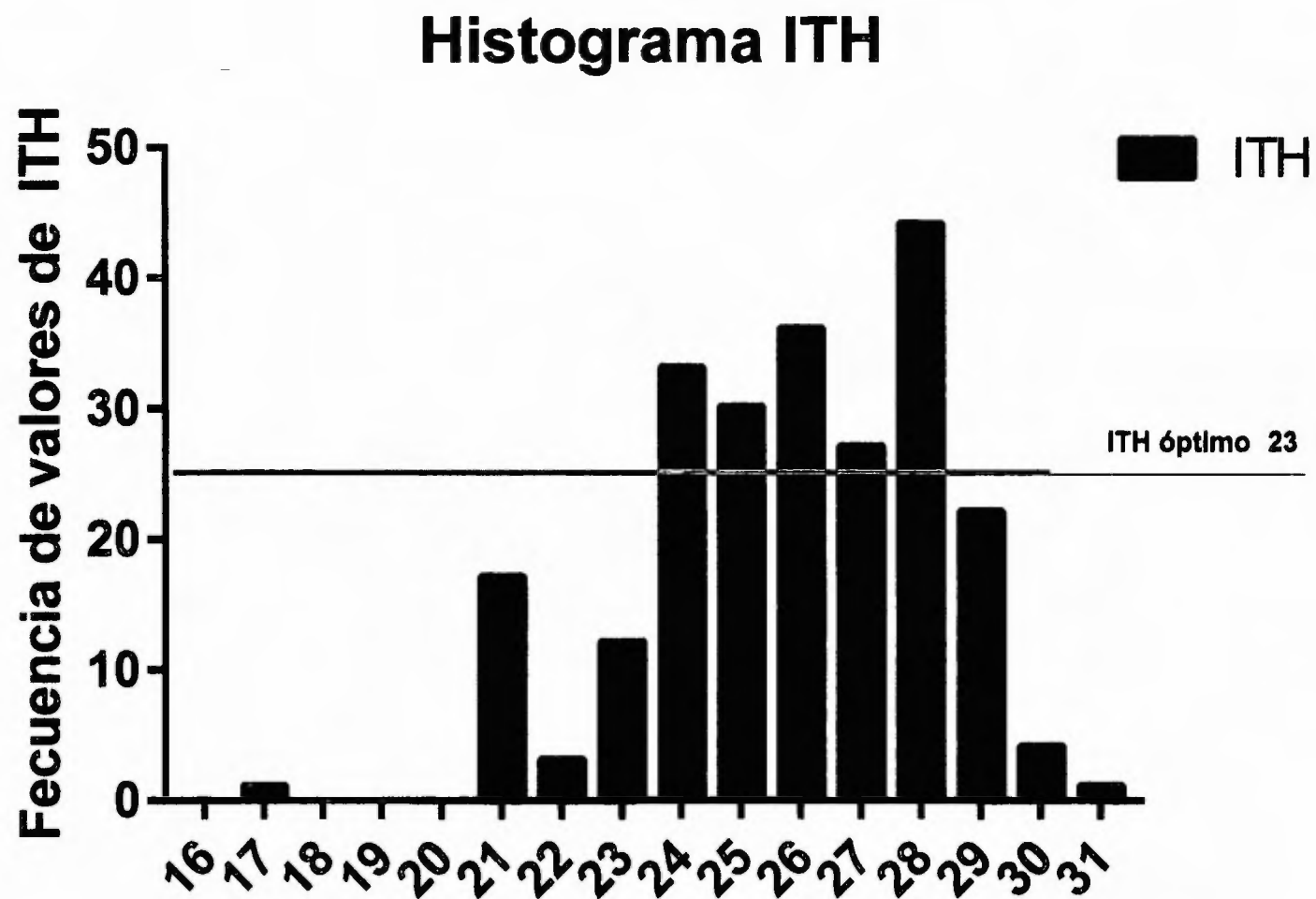


FIGURA 18 Representación gráfica de la frecuencia de los valores de ITH calculados

Cuadro 2 Prueba - KRUSKAL WALLIS

Analisis	ITH
Valor de P	< 0 0001
¿Es exacto o aproximado el valor de P?	Aproximado
¿Las medianas varían significativamente ($P < 0.05$)?	Si
Numero de grupos analizados	16
Resumen de los datos	
Numero de tratamientos (columnas)	16
Numero de valores (total)	232

Resultado de lo obtenido a través del programa GraphPad Prism 6.0 con la prueba Kruskal Wallis

CAPÍTULO V

CONCLUSIÓN

- 1 Esta investigacion ha permitido confirmar la utilidad de las tinciones de Giemsa y Naranja de Acridina, como prueba de tamizaje Estas nos aportan la presuncion de la presencia de hemoparasitos en la sangre de ovejas
- 2 La ventaja de la prueba molecular PCR en la deteccion de *Mycoplasma ovis* hallado en 1 de las 71 muestras de sangre de ovino nos permite implementar la tecnica molecular en el diagnóstico como metodo sensible especifico del hemoparasito
- 3 El diagnostico realizado a traves de las pruebas y la interpretacion emitida, se informa el primer reporte de *Mycoplasma ovis* en Panama.
- 4 Existe una connotacion en la evaluacion de los parametros ambientales realizada en la finca n°4 las cuales nos indica que estos factores ambientales permiten el desarrollo y transmision del microorganismo

CAPÍTULO VI RECOMENDACIÓN

- Se debe hacer un estudio por un periodo mas extenso para determinar la prevalencia de *Mycoplasma ovis* en ovinos en Panama
- Para las pruebas moleculares recomendamos aplicar una técnica que permita conocer la concentracion de ADN extraido
- Implementar dentro de la evaluacion de factores asociados a la presencia y transmision del hemoparasitos parámetros biológicos como temperatura rectal frecuencia cardiaca o frecuencia respiratoria para comprobar que ambos (parametros ambientales y fisiologicos) estan asociados al diagnostico

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre D.H., Thompson C, Neumann R.D, Salatin A.O., GAIDO A.B., Torioni S. 2009. "Brote de Mycoplasmosis Clínica por *M. ovis* en Ovinos de Salta Argentina". *Revista argentina de microbiología* vol. 41: 212 – 214.
- Arias RA.; Mader TL.; Escobar PC. 2008. "Factores climáticos que afectan el desempeño productivo del ganado bovino de carne y leche"; *Arch. Med. Vet.* 40, 7 – 22.
- ARP, ed. 1992. "Métodos Histo-tecnológicos". Instituto de patología de las Fuerzas Armadas de los EEUU (AFIP).
- Azzam-W, M., Cermeño-Vivas, J. R., Orellán-García, Y. & Penna V, S. J. 2002 "Vulvovaginitis por *Candida* spp. y *Trichomonas vaginalis* en mujeres sexualmente activas". *Invest. Clin.* 43, 3–13.
- Barrios C., 2007, "GUÍA PRACTICA DE OVINOCULTURA ENFOCADA HACIA LA PRODUCCIÓN DE CARNE", Empresa del sector agropecuaria y ambiental, Bogotá. <http://www.asoovinos.org/archivos/articulostecnicos/manualcriaovinosproduccioncarne.pdf>
- Benavides E., Guerra N., Valdivia V., Gutiérrez, D., Marco, C., Rozo, L., Milena, A. & Contreras, S. 2010. "Reporte de caso: pulicosis por *Ctenocephalides felis* en ovinos y caprinos en la sabana de Bogotá, Colombia". *Revista de Medicina Veterinaria*, (19), 123–135.
- Bolívar, A. M. 2013. "Metodología diagnóstica para hemoparásitos dentro de la ganadería bovina con énfasis en la reacción en cadena de la polimerasa y su variante múltiple". *Revista de Salud Animal*, 35(1), 1-9.
- Cardozo J., Velásquez JG., Flores H., Velásquez JH., Peña M. 2010. "Estrés Calórico: Efectos en el comportamiento reproductivo y adaptación de los bovinos al trópico"; Disponible en: www.mvz.unipaz.edu.co.
- Cienzo D.; 1996; "Evaluation of cattle breeds adapted to the tropics: Proceeding of international conference on livestock in the tropics". University of Florida May 5 – 7; Tampa Florida.
- Cortés-Vecino, J.A. 2011. "Garrapatas: estado actual y perspectivas". In. *Parasitología veterinaria. Congreso XX Latinoamericano de parasitología: Bogotá, Colombia* pp. 313-315.
- Cruz, G & Saravia, C. 2008. "Un índice de temperatura y humedad del aire para regionalizar la producción lechera en Uruguay". *Agrociencia* 12(1), 56–60.

- D.B. Morton, D Abbot, R Barclay, B S Close, R Ewbank, D Gask, M Heath, S Mattic, T Poole, J Seamer, J Southee, A Thompson, B Trussel, C West and M Jennings. 1993. “Extracción de Sangre en los Mamíferos y Aves de Laboratorio”. Artículo original en inglés publicado en *Laboratory Animals* vol. 27, 1-22.
<http://sea.umh.es/files/2011/07/Refinamiento-extracci%C3%B3n-sangre.pdf>
- De Pablo Miguel A., De Pablo C. 2010. "ARDUDROP 1.0: Dispositivo electrónico para el estudio de la humedad del suelo". *Tecnología@ y desarrollo*. ISSN 1696-8085. Vol.VII. 2010.
- Diazgrandos D. 2011. "*Tolerancia al calor de las razas Dorper y Kathadin a un ecosistema de bosque húmedo.*" Trabajo de graduación para optar por el título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agropecuaria. Escuela de Ciencias Pecuaria. David, Provincia de Chiriquí, Republica de Panamá.
- Dupreez JH. Giesecke WH., Hattingh PJ. 1990; “Heat stress in diary cattle and other livestock under Southern African conditions: I. Temperature – Humidity index mean values during the four main seasons “. *Onderstepoort J. Vete. Res.* 57; 77 – 87.
- Duque P. D. 2009. “Electroforesis del ADN en geles de agarosa”. Protocolos de laboratorio de la UEG (Unidad de Ecología Genética) del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.
<http://www.ivic.gob.ve/ecologia/ueg/formatos/Electroforesis%20del%20ADN%20en%20geles%20de%20agarosa.pdf>
- “El mundo de los animales”. 1971, Editorial Abril, *Volumen 44*, Italia, Paginas 52 –55.
- Gómez I., Pinzón R.; 1983, “*Problemas sanitarios que afectan la producción de ovinos y caprinos en las provincias de Panamá y Colon*”. Trabajo de graduación para optar por el título de licenciado en ingeniería agronómica con especialización en zootecnia. Panamá República de Panamá, Páginas 214.
- Hernández Y., Lobo E., Martínez S. y Zamora L. 2009. “Evaluación de Diferentes Métodos de Extracción de ADN de *Mycoplasma* para su Empleo en el Diagnostico por PCR”. *Revista Salud Animal*. Vol. 31 N°2: 108-114.

- Ingram D., Mount L., 1975. "Man and Animals in hot environments." *New York: Springer – Verlag*, 185 p.
- J. E. Sykes, L. L. Lindsay, R. G. Maggi, and E. B. Breitschwerdt. 2010. "Human coinfection with *Bartonella henselae* and two hemotropic mycoplasma variants resembling *Mycoplasma ovis*," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 48, no. 10, pp. 3782–3785.
- Johnson H.D. 1987. "Bioclimatology and adaptation of livestock". *Amsterdam: Elsevier*; 1987. 279p.
- Laboratorio de Genómica Viral y Humana – Facultad de Medicina – Universidad Autónoma de Potosí. Protocolos y métodos. 2008. "Preparación de Phosphate Buffered Saline (PBS)". http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_Buffer_PBS.pdf
- Lira-Amaya, J. J., Ojeda-Robertos, N. F., Álvarez-Martínez, J. A., Rojas-Martínez, C., Bautista-Garfias, C. R., & Figueroa-Millán, J. V. 2015. "Identificación de garrapatas en una explotación de ovinos". *Entomología Mexicana vol.2*; 721 – 726.
- M.E. Ensminger, 1970 "*Producción Ovina*", , Editorial El Ateneo, Cuarta edición.
- Mendives M., 2007, "Importancia de los ovinos tropicales introducidos al país: Características productivas y reproductivas". *XX reunión ALPA, XXX reunión APPA – Cusco – Perú Arch. Latinoam. Prod. Anim. Volumen 15 (Supl.1)*.
- Molina F.C. Dra. 2012. "Amplificación de ácidos nucleicos para el diagnóstico de infecciones por *Micoplasmas* y *Ureaplasmas* de interés clínico en Cuba". *Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias de la Salud*. <http://tesis.repo.sld.cu/478/1/FernandezMolinaC.pdf>
- Murray P. R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller M.A., Tenover F.C. 2003. "*Manual of Clinical microbiology*". Octava edición. Páginas: 362 – 365.
- M. K. Cynthia, 2007. "*Manual MERCK de veterinaria*". Editorial Oceano. Novena edición. Páginas. 8-26.
- Nacimiento A., Santos P., Guimares S., Breur G. y Messick J. 2011. "*PCR Detection of Mycoplasma haemovis in Sheep*". <http://www.asvcp.org/meeting/2011/posters/181.pdf>

- Neiva J, Teixeira M., Turco S. 2004. “Efeito do estresse climático sobre os parâmetros produtivos e fisiológicos de ovinos Santas Inês mantidos em confinamento na região litorânea do Nordeste do Brasil”; *Revista Brasileira de Zootecnia Viçosa*, v.33, n.3; p. 668 – 678.
- NRC, National Research Council, 1981, “*Effect of enviroment on nutrient requirement of domestic animals. National Academy Press*”, Washington DC, USA.
- Olaechea, F., Corley, J., Larroza, M., Raffo, F. & Cabrera, R. 2006. “Ingreso y evolución del parasitismo por *Melophagus ovinus* en una majada Corriedale en el noroeste de la Patagonia Argentina”. *Parasitol Latinoam* **61**, 86–89.
- Olaechea, F. V, Larroza, M., Cabrera, R. & Raffo, Y. 2007. “*Melophagus Ovinus*: infestación experimental de ovinos y supervivencia del parásito en el medio ambiente”. *Rev. Med. Vet. (Buenos aires)*. **88**(4), 158.
- Pereyra N., Cane F. 2005. “Revisión y nuevas perspectivas de estudio de la enfermedad producida por *Mycoplasma suis* (antes *Eperythrozoon suis*)”
[http://www.ciap.org.ar/ciap/Sitio/Materiales/Capacitacion/Fericerdo%202005/Revision%20y%20nuevas%20prespectivas%20de%20estudio%20de%20la%20enfermedad%20producida%20por%20Mycoplasma%20suis%20\(antes%20Eperythrozoon%20suis\).pdf](http://www.ciap.org.ar/ciap/Sitio/Materiales/Capacitacion/Fericerdo%202005/Revision%20y%20nuevas%20prespectivas%20de%20estudio%20de%20la%20enfermedad%20producida%20por%20Mycoplasma%20suis%20(antes%20Eperythrozoon%20suis).pdf)
- Pérez Monrás, M. F., Cabrera Cantelar, N., Batlle Almodóvar, M. D. C., & Estévez Fernández, R. 2002. “Etiología bacteriana de las infecciones respiratorias agudas en pacientes VIH/SIDA”. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, **54**(2), 147-151.
- Producción ovina, 1973, Editorial El Ateneo, págs.24 – 46.
- Quintana, R., Prieto, M. F., Bagilet, D. H., Dalman, M. C., & Gregorini, E. 2008. Naranja de acridina para el diagnóstico de bacteriemias relacionadas con catéteres. *Medicina intensiva*, **32**(4), 168-171.
- Robin W. Allison, Jane E. Sykes.2011. “*Mycoplasma-Hemotropics-Hemoplasma*”. The Merck veterinary manual.
<http://www.merckmanuals.com/vet/circulatorysystem/bloodparasites/hemotropcmycoplasmas.html>.

- Rodríguez, I., Gern, L., Rais, O., Fuentes, O., González, R., & Fernández, C. 2009. “Detección molecular de patógenos emergentes de importancia médica y veterinaria en garrapatas capturadas sobre caballos domésticos”. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 61(1).
- Romano H., Thatcher W., Wilcox CJ. 1981, “Hormonal interrelationships and physiological responses of lactating dairy cows to a shade management system in a subtropical environment”. *Theriogenology* 1981; 16: 139 – 154.23.
- Romano M. JL.; Martínez R., 2010. “Adaptación de los ovinos a climas cálidos y productividad. Fortalecimiento del sistema producto ovino”. *Tecnología para ovinocultores. Serie: Producción*. 153 - 156.
- Rubio-Palis, Y, Pérez, E, Sánchez, V., & Paéz, E. 2007. “Evaluación de tres métodos de captura de anofelinos en un área endémica de malaria del estado Bolívar, Venezuela”. *Entomotropica*, 17(2).
- Sañudo Astiz Carlos. 2008. “Calidad de la canal y de la carne ovina y caprina y los gustos de los consumidores”. *R. Bras. Zootec.*, v.37, suplemento especial p.143-160.
<http://www.scielo.br/pdf/rbz/v37nspe/a18v37nsp.pdf>
- Souza, B.B. 2007. “Adaptabilidade e bem-estar em animais de produção”. Artículo disponible en: www.infobibos.com/Artigos/2007_4/Adaptabilidade/index.htm
- Somma M., QuerciM.2006. “*The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms, Session 5. Agarose Gel Electrophoresis*”. Comisión Europea. <http://gmocrl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20EN/Session05.pdf>
- U. Macías-Cruz, F. Álvarez-Valenzuela, J. Rodríguez-García, A. Correa-Calderón, N. Torrentera-Olivera, L. Molina-Ramírez, and L. Avendaño-Reyes. 2010. “Crecimiento y características de canal en corderos Pelibuey puros y cruzados F1 con razas Dorper y Katahdin en confinamiento” *Arch Med Vet*, vol. 42, pp. 147–154.
- V. Nava-López, J. Oliva-Hernández, and J. Hinojosa-Cuellar. 2014. “Mortalidad de los ovinos de pelo en tres épocas climáticas en un rebaño comercial en la Chontalpa, Tabasco, México”. *Ecosistemas y Recur.Agropecu., Agropecu.*, vol. 22, nos. 2.

ANEXOS



UNIVERSIDAD DE PANAMA
PROGRAMA DE MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA AMBIENTAL
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

Objetivo de la encuesta: Recopilar datos que nos permita conocer los aspectos generales de la zootecnia del ovino.

Esta encuesta se completa bajo el consentimiento del informante.

Fecha: 23-4-18 Apellido y nombre: Enrique Lora

Firma: [Signature]

I. IDENTIFICACIÓN DEL ESTABLECIMIENTO

Ubicación del establecimiento: Capira, corregimiento de Cairito
01 las arriba

DATOS DEL CLIMA	
Temperatura	<u>31°C</u>
Humedad	<u>89%</u>

Coordenadas: 613728974290 utm

Superficie total (hectáreas): 91 hecta
Hectáreas

II. DATOS DE GANADARIA

Indicar con una X la respuesta que aplica en la cría de sus ovinos:

RAZA DE OVINO					
Suffolk		Pelibuey,		Dorset	
Dorper		Black belly		Manchega	
Katahdin		Texel		Cheviot	
Otra	<u>Pelibuey con Criollo</u>				

OVINOS	TOTAL
HEMBRA	<u>5</u>
MACHOS	<u>7</u>
CORDEROS	<u>4</u>

TIPO DE ALIMENTO	
Pastoreo	<input checked="" type="checkbox"/>
Pastoreo + Pasto corte	<input type="checkbox"/>
Heno	<input type="checkbox"/>
Pastoreo + Pasto corte	<input type="checkbox"/>
Pastoreo + Heno + Residuo	<input type="checkbox"/>
Pastoreo + Otros	<input type="checkbox"/>
Mezcla de las anteriores	<input type="checkbox"/>

MÉTODO PARA IDENTIFICAR A LOS OVINOS	
Caravanas	<u>ninguna</u>
Tatuajes	<u>ninguna</u>
Corte de oreja	<u>ninguna</u>
Collares	<u>ninguna</u>
Observación	<u>Sin identificar</u>

CUADRO A.1 CODIGO DE LAS MUESTRAS			
Fecha	Lugar de muestreo	Identificacion de la muestra	Codigo de las muestras
06 – 05 – 2014	TOCUMEN	347	M1a – 14
		359	M1b – 14
		348	M1c – 14
		543	M1d – 14
		549	M1e – 14
		523	M1f – 14
		540	M1g – 14
		342	M1h – 14
		310	M1i – 14
		351	M1j – 14
		227	M1k – 14
		144	M1l – 14
		289	M1m – 14
		226	M1n – 14
		248	M1o – 14
		530	M1p – 14
		532	M1q – 14
		339	M1r – 14
		545	M1s – 14
		209	M1t – 14
10 – 06 – 2014	ARRAIJAN	54 – G1	M2a – 14
		51 – G1	M2b – 14
		68 – Grupo 2	M2c – 14
		BEICH – Grupo 2	M2d – 14
		117 – G1	M2e – 14
		G2 – Oveja Roja	M2f – 14
		G#3 – A21	M2g – 14
		G#3 – A30	M2h – 14
		Hembra #50	M2i – 14
		M#104	M2j – 14
		G4 – Macho #45	M2k – 14
		33	M2l – 14
4 – 09 – 2014	ARRAIJAN	8	M3a – 14
		P5	M3b – 14
		12	M3c – 14
		7	M3d – 14
		17	M3e – 14
		19	M3f – 14
		16	M3g – 14
3 – 10 – 2014	CAPIRA	8	M4a – 14
		Mα	M4b – 14
		M2	M4c – 14

3 – 10 – 2014	CAPIRA	12	M4d – 14
		17	M4e – 14
		13	M4f – 14
		MCL	M4g – 14
		16	M4h – 14
		19	M4i – 14
		7	M4j – 14
13 – 11 – 2014	CHORRERA	C6	M5a – 14
		C4	M5b – 14
		C3	M5c – 14
		D5	M5d – 14
		D8	M5e – 14
		C2	M5f – 14
		A1g5	M5g – 14
		A4g5	M5h – 14
		B5	M5i – 14
		B1	M5j – 14
6 – 12 – 2014	CHAME	1	M6a – 14
		2	M6b – 14
		3	M6c – 14
		4	M6d – 14
		5	M6e – 14
		6	M6f – 14
		7	M6g – 14
		8	M6h – 14
		9	M6i – 14
		10	M6j – 14
		11	M6k – 14
		12	M6l – 14

CUADRO A 2 Placas sospechosas		
Fecha de muestreo	Identificación de la muestra.	Código de la muestra.
6-5-14	347	M1a-14
	342	M1h-14
	248	M1o-14
	545	M1s-14
	209	M1t-14
	543	M1d-14
	549	M1e-14
	523	M1f-14
	540	M1g-14
	144	M1l-14
	289	M1m-14
	226	M1n-14
	530	M1p-14
	532	M1q-14
	339	M1r-14
	359	M1b-14
	348	M1c-14
10-6-14	51-G1	M2b-14
	117-G1	M2e-14
	G4-104 M	M2j-14
	G4-Macho #45	M2k-14
	33	M2l-14
3-10-14	007	M4j-14
	008	M4a-14
	012	M4d-14
	013	M4f-14
	017	M4e-14
	Mcl	M4g-14
	016	M4h-14
13-11-14	C4	M5b-14
	C6	M5a-14
	C3	M5c-14
	D8	M5e-14
	A1g5	M5g-14
	C2	M5f-14
6-12-14	2	M6b-14
	3	M6c-14
	4	M6d-14
	5	M6e-14
	6	M6f-14
	7	M6g-14

CUADRO A 3 DATOS REGISTRADOS POR EL ARDUDROP 1 0 Y CALCULO DE ITH

DIA 3 DE JUNIO 2015		DIA 4 DE JUNIO 2015		DIA 5 DE JUNIO 2015	
Temperatura ambiental °C	HUMEDAD RELATIVA %	Temperatura ambiental °C	HUMEDAD RELATIVA %	Temperatura ambiental °C	HUMEDAD RELATIVA %
29,9	76 6	27 4	85 6	25 2	63 2
29 3	77 8	27 3	86 0	25 4	62,8
28 8	79 2	27 1	86 6	25,6	65,7
28 6	79,8	27 1	86 8	26 0	64,9
28,2	81 8	26 9	87 5	26,5	62 3
27 7	84 3	26 9	87 6	22,6	64,6
		26 8	88 0	22,0	67,0
		27 8	82 2	22 0	67,2
		30 1	73 1	22,0	67,0
		31 2	69 2	22 0	67 5
		34 6	57 0	21 9	67,1
		35 5	53 5	22 0	68 3
		35 8	54 5		
		32 9	64 2		
		28 6	76 9		
		26 2	88 1		
		26 3	77 7		

DIA 6 DE JUNIO 2015		DIA 7 DE JUNIO 2015		DIA 8 DE JUNIO 2015	
Temperatura ambiental °C	HUMEDAD RELATIVA %	Temperatura ambiental °C	HUMEDAD RELATIVA %	Temperatura ambiental °C	HUMEDAD RELATIVA %
22 1	69 1	23 6	96 0	26 7	89 6
21 9	68 1	23 1	96 0	28 0	83 2
21,9	68 6	22,8	96 1	30 1	73,4
21,9	69,3	22 6	96,3	30 8	71,6
21,8	68 4	22 5	96,7	30 6	72 5
21,7	69 1	22,6	96,6	30 3	73,8
21 9	70 4	22,9	96 8	27 0	83,3
21 8	69,6	24 6	95 2	25 3	87,6
21,8	70 1	26 9	86 7	25 8	88 3
22 13	73 6	29 1	76,0	25,6	89 3
32,3	59 5	31 0	68 2	24 9	90,5
34 3	52 5	31,2	68,2	24 4	93,3
33 6	55 2	31 6	65 0	24 3	94 4
33 0	57 1	30,6	69,2	24,1	95,1
32 9	59 5	25 5	89 5	23 9	96 0
30 6	70 0	23 3	98,8	24 5	99 4
27 4	82 3	23,8	97 5		
25 4	93 2	23 7	96 8		
24 7	93 6	23 5	97 6		
24 1	93 6	23 4	97 5		
24 1	94 6	23 2	98 1		
23 8	95 7	23 1	99 0		
		23 2	98 2		
		24 4	98 6		

DIA 9 DE JUNIO 2015		10 DE JUNIO 2015	
Temperatura ambiental °C	HUMEDAD RELATIVA %	Temperatura ambiental °C	HUMEDAD RELATIVA %
25,2	96 6	25,4	94 4
25 3	94 0	27 2	85 2
24 0	95,2	30 0	73,8
24,1	96 2	30,2	72 5
24 0	97,1	27,7	79 3
24 8	95,3	27 9	78 7
26 4	89,9	27 9	79 4
27 4	85 5	26 5	85 1
27 6	83 1	27 0	83 8
27,0	83,5	26,4	88 9
25 8	88,6	25 3	91 9
24,6	95 3	25 1	92 6
24 0	96 6	24 6	94 9
23 9	96 4	24 0	96 3
23 8	96 8	25 6	90 6
23 6	97 4	25 7	90 0
23 7	101 6	26 1	90 6

DIA 11 DE JUNIO 2015		DIA 12 DE JUNIO 2015		DIA 13 DE JUNIO 2015	
Temperatura ambiental °C	HUMEDAD RELATIVA %	Temperatura ambiental °C	HUMEDAD RELATIVA %	Temperatura ambiental °C	HUMEDAD RELATIVA %
28 0	80,9	24 6	94 5	25 9	91 0
29,6	73 8	24 4	95,5	25,9	92 0
30,1	72 6	24,6	94 6	25 7	93,2
29 7	72 4	24 4	95 5	30 2	76,5
30 9	67,7	28,7	79 0	30 8	71,7
32,3	61 0	29 0	77,2	32 3	66,0
32,6	61 0	31 0	70 4	32 6	65,4
31,4	66 2	32 1	66,4	33 0	64 9
29 4	74 8	32,6	63 2	33 1	65,0
28,5	77 5	31 9	68 0	32,9	67,0
27,3	80 5	31 8	69 0	28 8	82 5
26,2	85,9	31,4	69 2	25 3	96,5
25,6	90,2	30 0	75,3	26 0	95 9
24,9	93 0	28,7	79 0	25 8	97 4
24 6	93 9	27 7	82,7	25 3	99 3
24 4	94 7	26 8	86 3	25 3	99 0
		26 2	89,6	25 1	98 6
		26 0	90 3	25 1	98 6
		25 9	90 6		
		25 9	91 1		

DIA 14 DE JUNIO 2015		DIA 15 DE JUNIO 2015			DIA 16 DE JUNIO 2015
Temperatura ambiental °C	HUMEDAD RELATIVA %	Temperatura ambiental °C	HUMEDAD RELATIVA %	Temperatura ambiental °C	HUMEDAD RELATIVA - % -
27 3	90 2	27 6	88 2	27 6	89 7
28,0	86 4	29 2	79 8	28 7	84,3
29,6	79,0	30,9	71 4	30,0	77,9
29,8	77,0	31,0	70 7	30 2	75,8
30 7	74,5	31,8	68 7	30,3	75,5
30 7	73 4	31,2	72 0	30,9	74,8
29,4	77 7	30 3	76 3	30 7	74 6
27,0	91 2	30,5	74 2	29,6	78,2
27,8	84 9	29 4	78,3	29 0	81 0
27,4	84,0	28 6	82 6	28,3	83 6
26 9	87 3	27 3	87 6	27 5	87 6
26 4	89 5				
26 3	90 2				

DIA 17 DE JUNIO 2015		18 DE JUNIO 2015	
Temperatura ambiental °C	HUMEDAD RELATIVA %	Temperatura ambiental °C	HUMEDAD RELATIVA %
27,7	88 9	28,8	85 5
29 7	80,4	31,0	76 3
30 7	73 3		
32 4	65 8		
33,1	63 8		
32,9	64 4		
32 4	67,4		
30 0	81 8		
28 4	90 3		
27 6	91 2		

CUADRO A 4 INDICE DE TEMPERATURA HUMEDAD EN LA FINCA N°4 DONDE SE DETECTÒ LA MUESTRA POSITIVA

FECHA	3/6/15	4/6/15	5/6/15	6/6/15	7/6/15	8/6/15	9/6/15	10/6/15	11/6/15	12/6/15	13/6/15	14/6/15	15/6/15	16/6/15	17/6/15	18/6/15
ITH	27 9	26 4	23	20 8	23 4	26	25	25 1	26 6	24 3	25 3	26 6	26 7	26 9	26 9	27 7
	27 5	26 3	23 1	20 6	23	26 7	25	26 2	27 4	24 2	25 6	27	27 6	27 5	28 1	28 8
	27 2	26 2	23 5	20 6	22 6	27 8	23 7	27 8	27 7	24 3	25 3	27 8	28 3	28 1	28 3	
	27 4	26 2	23 8	20 6	22 4	28 2	23 9	27 8	27 4	24 2	28 2	27 9	28 3	28 1	29	
	26 8	26 0	24	20 5	22 4	28	23 8	26 2	28	27	28 2	28 4	28 8	28 2	29 4	
	26 6	26 0	21	20 5	22 4	28	24 5	26 3	28 5	27 2	29	28 3	28 6	28 6	29 3	
		26 0	20 6	20 7	22 8	26	25 7	26 4	28 7	28 3	29 1	27 5	28 2	28 4	29 2	
		26 5	20 6	20 6	24 3	24 6	26 4	25 5	28 2	28 8	29 4	26 4	28 2	27 8	28 4	
		27 8	20 6	20 6	26	25 1	26 4	25 9	27 3	28 9	30	26 7	27 6	27 5	27 7	
		28 4	20 6	21 0	27 1	25	25 8	25 7	26 8	28 8	29 5	26 3	27 2	27	27	
		29 8	20 5	16 6	28 1	24 4	25 1	24 8	25 9	28 8	27 4	26	26 4	26 6		
		30 1	20 7	29 1	28 3	24	24 3	24 7	25 3	28 5	25 1	25 7				
		31 0		28 9	28 3	24	23 8	24 3	25	27 9	25 7	25 7				
		29 3		28 6	28	23 8	23 7	23 8	24 5	27	25 6					
		26 8		28 8	25	23 7	23 6	25	24 3	26 4	25 3					
		25 4		28	23 2	24 5	23 5	25 1	24 1	25 9	25 2					
		24 8		26 1	24		23 8	25 5		25 5	25					
				25	23 5					25 4	25					
				24 3	23 4					25 3						
				23 8	23 3					25 3						
				23 8	23 1											
				23 6	23 1											
					23 1											
					24 3											

Tomando en cuenta que el indice de confort de los ovinos es 23 podemos observar que solo los dias 5, 6 y 7 de Junio se mantuvieron dentro del indice no asi con el resto del tiempo

CUADRO A 5 ESTADISTICO DESCRIPTIVO DE ITH REGISTRADO

	3/6/15	4/6/15	5/6/15	6/6/15	7/6/15	8/6/15	9/6/15	10/6/15	11/6/15	12/6/15	13/6/15	14/6/15	15/6/15	16/6/15	17/6/15	18/6/15
Numero de valores	6	17	12	22	24	16	17	17	16	20	18	13	11	11	10	2
Valor Mínimo	26 6	24 8	20 5	16 6	22 4	23 7	23 5	23 8	24 1	24 2	25	25 7	26 4	26 6	26 9	27 7
25% Percentil	26 75	26	20 6	20 6	23 03	24 1	23 75	24 9	25 08	25 3	25 28	26 15	27 2	27	27 53	27 7
Mediana	27 3	26 4	20 85	22 3	23 4	25 05	24 3	25 5	27 05	26 7	25 65	26 7	28 2	27 8	28 35	28 25
75% Percentil	27 6	28 85	23 4	26 58	25 75	27 53	25 4	26 25	27 93	28 45	29 03	27 85	28 3	28 2	29 23	28 8
Valor Máximo	27 9	31	24	29 1	28 3	28 2	26 4	27 8	28 7	28 9	30	28 4	28 8	28 6	29 4	28 8
Media	27 23	27 24	21 83	23 32	24 38	25 61	24 59	25 65	26 61	26 6	26 88	26 95	27 81	27 7	28 33	28 25
Desviación estándar	0 4761	1 824	1 482	3 606	2 061	1 651	1 001	1 085	1 555	1 737	1 9	0 9483	0 779	0 6557	0 9166	0 7778
Error estándar de la media	0 1944	0 4423	0 4277	0 7688	0 4208	0 4127	0 2428	0 2632	0 3886	0 3885	0 4477	0 263	0 2349	0 1977	0 2898	0 55
Lower 95% CI of mean	26 73	26 3	20 89	21 72	23 51	24 73	24 07	25 09	25 78	25 79	25 94	26 37	27 29	27 26	27 67	21 26
Upper 95% CI of mean	27 73	28 17	22 77	24 92	25 25	26 49	25 1	26 21	27 43	27 41	27 83	27 52	28 33	28 14	28 99	35 24
PRUEBA DE SHAPIO – WILK																
Valor W	0 9728	0 8773	0 7616	0 8777	0 7969	0 8721	0 8666	0 9511	0 9208	0 8948	0 8132	0 9301	0 9213	0 9455	0 9127	Número muy pequeño
Valor P	0 9108	0 0288	0 0035	0 0109	0 0003	0 0293	0 0194	0 4745	0 1737	0 0330	0 0023	0 3418	0 3300	0 5871	0 3001	
¿Pasa la prueba de normalidad (alfa=0 05)?	Yes	No	No	No	No	No	No	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	
Sumatoria	163 4	463	262	513 1	585 1	409 8	418	436 1	425 7	532	483 9	350 3	305 9	304 7	283 3	56 5